



Brizuela, Natalia Soledad

Cepas patagónicas de *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* como cultivos iniciadores de la fermentación maloláctica : estudio de las propiedades enológicas y tecnológicas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Brizuela, N. (2019). *Cepas patagónicas de Lactobacillus plantarum y Oenococcus oeni como cultivos iniciadores de la fermentación maloláctica: estudio de las propiedades enológicas y tecnológicas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2023>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Cepas patagónicas de *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* como cultivos iniciadores de la fermentación maloláctica: estudio de las propiedades enológicas y tecnológicas

TESIS DOCTORAL

Natalia Soledad Brizuela

nsbrizuela@gmail.com

Resumen

Resulta relevante estudiar la capacidad de las cepas patagónicas seleccionadas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*, como cultivos iniciadores para conducir la FML en vinos tintos. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos: Optimizar las condiciones de aclimatación, inoculación y fermentación en vino estéril; Optimizar las condiciones de preservación de cepas de *O. oeni* y *Lb. Plantarum*; Analizar los compuestos volátiles producidos en un vino Pinot noir inoculado con cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y *O. oeni*; Estudiar la capacidad de implantación de cepas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* en un vino Malbec y evaluar las modificaciones en el perfil de compuestos volátiles producidas por la fermentación maloláctica. El propósito final es seleccionar las cepas mejor adaptadas a las condiciones de crecimiento en vino y con mayor impacto en las propiedades organolépticas del mismo, asegurando una calidad controlada y diferencial, que incremente el valor agregado de los vinos tintos patagónicos.

TESIS DOCTORAL

Cepas patagónicas de *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* como cultivos iniciadores de la fermentación maloláctica: estudio de las propiedades enológicas y tecnológicas

Lic. Natalia Soledad Brizuela

Directora: Dra. E. Elizabeth Tymczynsyn

Co-Directora: Dra. Liliana C. Semorile



Diciembre 2019



*“¿En qué reino, en qué siglo, bajo qué silenciosa
conjunción de los astros, en qué secreto día
que el mármol no ha salvado, surgió la valerosa
y singular idea de inventar la alegría?”*

*Con otoños de oro la inventaron. El vino
fluye rojo a lo largo de las generaciones
como el río del tiempo y en el arduo camino
nos prodiga su música, su fuego y sus leones.*

*En la noche del júbilo o en la jornada adversa
exalta la alegría o mitiga el espanto
y el ditirambo nuevo que este día le canto*

*otrora lo cantaron el árabe y el persa.
Vino, enséñame el arte de ver mi propia historia
como si ésta ya fuera ceniza en la memoria”.*

Soneto del vino

Jorge Luis Borges

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se publicaron en:

Publicaciones con referato

1. Bravo-Ferrada, B.M., Brizuela, N., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., Semorile, L. & Tymczyszyn, E.E. (2015). Effect of protective agents and previous acclimation on ethanol resistance of frozen and freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strains. *Cryobiology*, 71(3), 522-528.
2. Bravo-Ferrada, B.M., Hollmann, A., Brizuela, N., Valdés La Hens, D., Tymczyszyn, E. & Semorile, L. (2016). Growth and consumption of l-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiologica*, 61(5), 365-373.
3. Brizuela, N.S., Bravo-Ferrada, B.M., Valdés La Hens, D., Hollmann, A., Delfederico, L., Caballero, A., Tymczyszyn, E.E. & Semorile, L. (2017). Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *LWT*, 77, 348-355.
4. Brizuela, N. S., Bravo-Ferrada, B.M., Pozo-Bayón, M.Á., Semorile, L. & Tymczyszyn, E.E. (2018a). Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains. *Food Research International*, 106, 22-28.
5. Brizuela, N.S., Bravo Ferrada, B.M., Curilén, Y., Delfederico, L., Caballero, A., Semorile, L.C., Pozo-Bayón, M.Á. & Tymczyszyn, E.E. (2018b). Advantages of using blend cultures of native *L. plantarum* and *O. oeni* strains to induce Malolactic fermentation of Patagonian Malbec wine. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2109.
6. Brizuela, N., Tymczyszyn, E.E., Semorile, L.C., Valdés La Hens, D., Delfederico, L., Hollmann, A. & Bravo-Ferrada, B. (2019). *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: A new (old) player? *Electronic Journal of Biotechnology*, 38: 10-18.
7. Bravo-Ferrada, B.M., Gonçalves, S., Semorile, L., Santos, N.C., Brizuela, N.S., Tymczyszyn, E.E. & Hollmann, A. (2018). Cell surface damage and morphological changes in *Oenococcus oeni* after freeze-drying and incubation in synthetic wine. *Cryobiology*, 82, 15-21.

Capítulo de Libro

Valdés La Hens D, Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Tymczyszyn EE, Hollmann A, Delfederico L, Semorile L, pp 297-328. *Biology and Biotechnology of Patagonian*

Microorganisms - Part II – Patagonian microorganisms for industrial and sanitary applications. Chapter 14 - Indigenous lactic acid bacteria communities associated with malolactic fermentation in Patagonian wines: basic and applied perspectives. Ed.: Olivera N, Libkind D, Donati E. Springer, Berlín, 2016. ISBN 978-3-319-42801-7.

Artículos de Divulgación

LACTIC ACID BACTERIA FROM PATAGONIAN RED WINES. Blog Science and Wine. Portugal. Autores: Brizuela NS, Tymczyszyn EE, Semorile L.
<https://www.ciencia-e-vinho.com/2018/06/17/lactic-acid-bacteria-from-patagonian-red-wines/>.

MODIFICACIONES EN EL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE VINO PINOT NOIR POR ACCIÓN METABÓLICA DE CEPAS PATAGÓNICAS DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* Y DE *OENOCOCCUS OENI*. Blog Observatorio Vitivinícola Argentino. Argentina. Autores: Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, Pozo-Bayón MA, Semorile L, Tymczyszyn EE.
<http://www.observatoriova.com/2018/06/modificaciones-en-el-perfil-de-compuestos-volaticos-de-vino-pinot-noir-por-accion-metabolica-de-cepas-patagonicas-de-lactobacillus-plantarium-y-de-oenococcus-oeni/>

Presentaciones en Reuniones Científicas

- Estudio de los compuestos aromáticos producidos durante la fermentación maloláctica en vinos patagónicos inoculados con cepas autóctonas de *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni*. Brizuela, N.S; Bravo-Ferrada, B.M; Tymczyszyn, E.E; Pozo-Bayón, M.A; Semorile, L. XVI Congreso CYTAL - Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 18 al 20-09-2017.

- Estudio del daño de la superficie celular en una cepa de *Oenococcus oeni* inoculada en vino sintético: efecto de la pre-aclimatación y posterior liofilización. Bravo-Ferrada, B.M; Brizuela, N.S; Cerdeira, V; Hollmann, A; Semorile, L; Tymczyszyn, E.E. XVI Congreso CYTAL - Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 18 al 20-09-2017.

- Molecular tools for selection and characterization of lactic acid bacteria associated with Patagonian red wines. Brizuela, N.S; Manera, C; Bravo-Ferrada, B.M; Valdés La Hens, D; Olguin, N; Delfederico, Hollmann, A; Caballero, A; Semorile, L; Tymczyszyn, E.E. XXth GIESCO 2017 – International Meeting, Mendoza, Argentina, 5 al 10-11-2017.

- Protectant effect of sugars on preservation of lactic acid bacteria. Exposición Oral Brizuela NS, Gerbino E, Semorile L, Bravo-Ferrada BM, Gómez-Zavaglia A, Tymczyszyn EE. Simposio SIBAL 2016 - V International Symposium on Lactic Acid Bacteria, CERELA, Tucumán, Argentina. 19 al 21-10-2016.

- Evaluation of indigenous lactic acid bacteria associated with Patagonian wines for their use as malolactic starter cultures”. Valdés La Hens D, Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Tymczyszyn EE, Delfederico L, Semorile L. Simposio SIBAL 2016 - V International Symposium on Lactic Acid Bacteria, CERELA, Tucumán, Argentina. 19 al 21-10-2016.

- Efecto de la adaptación y de diferentes crio-protectores sobre la congelación y liofilización de cepas de *Lb. plantarum* de interés enológico. Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Gerbino E, Gómez-Zavaglia A, Tymczyszyn EE, Semorile L. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios, Buenos Aires, Argentina. 3 al 5-11-2015.
- Optimización del proceso de vinificación a escala de laboratorio utilizando cepas de *L. plantarum* y *O. oeni* aisladas de vinos patagónicos. Efecto de la aclimatación sobre el crecimiento y consumo de ácido málico. Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, Tymczyszyn EE, Valdés La Hens D, Hollmann A, Caballero A, Semorile L. II Jornadas de Doctorandos y Estudiantes Avanzados del Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. 13 al 15-10-2015.
- Effect of sucrose, trehalose and glutamate on the resistance to ethanol of frozen and freeze-dried acclimated oenological *Lactobacillus plantarum* strains. Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Gerbino E, Gómez-Zavaglia A, Tymczyszyn EE, Semorile E. The 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ostrava, República Checa. 26 al 29-07-2015.
- Selección de cepas patagónicas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* en base a sus características enológicas. Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, Tymczyszyn EE, Valdés La Hens D, Delfederico L, Hollmann A, Caballero A, Semorile L. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC), Córdoba, Argentina, 17 al 19-11-2014.
- Propiedades superficiales y permeabilidad de membrana de una cepa de *Lactobacillus plantarum* de interés enológico, aclimatada, liofilizada, e inoculada en vino sintético. Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Tymczyszyn EE, Valdés La Hens D, Delfederico L, Hollmann A, Caballero A, Semorile L. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC), Córdoba, Argentina, 17 al 19-11-2014.
- Selection of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* isolates to be used as indigenous starter cultures for malolactic fermentation of Patagonian wines. Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, Delfederico L, Semorile L. IX Congreso de Microbiología General, Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE), Rosario, Argentina, 05 al 07-08-2013.

INDICE

Introducción General

I.1 La industria vitivinícola en Argentina	1
I.1.2 Región vitivinícola Sur	4
1.3 Elaboración del vino	6
I.2 Comunidad microbiana durante la fermentación vínica.....	7
I.2.1 Fermentación maloláctica (FML).....	9
I.2.2 Actividad maloláctica	12
I.3 Cultivos iniciadores de fermentación	17
I.4 Estudios de BAL nativas de vinos tintos patagónicos	22
Objetivos.....	26

CAPÍTULO 1: Optimización de las condiciones de aclimatación, inoculación y fermentación en vino estéril

1.1 Introducción	27
1.2 Objetivo	30
1.3 Materiales y Métodos.....	30
1.3.1 Cepas y condiciones de crecimiento	30
1.3.1.1 Composición de medios de cultivos	32
1.3.2 Aclimatación de cultivos	32
1.3.3 Recuento de bacterias viables	32
1.3.4 Fermentación en vino estéril	33
1.3.5 Consumo de ácido L-málico	34
1.3.6 Reproducibilidad de los resultados	35
1.4 Resultados.....	36
1.4.1 Ensayos de fermentación en vino Pinot noir estéril inoculado con cepas de <i>Lb. plantarum</i>	36
1.4.2 Ensayos de fermentación en vino Pinot noir estéril inoculado con cepas de <i>O. oeni</i>	40
1.5 Discusión.....	46
1.6 Conclusiones	50

CAPÍTULO 2: Optimización de las condiciones de aclimatación, preservación e inoculación de cultivos de cepas de *O. oeni* y *L. plantarum*.

2.1 Introducción	51
2.2 Objetivo	54
2.3 Materiales y Métodos.....	55
2.3.1 Cepas, medios y condiciones de crecimiento	55
2.3.2 Condiciones de aclimatación de cultivos	55
2.3.3 Condiciones de liofilización y congelación	55
2.3.4 Tolerancia bacteriana a la incubación en vino sintético luego de la preservación.....	56
2.3.5 Recuento de bacterias viables	56
2.3.6 Re-hidratación celular y efecto sobre la incubación en vino tinto estéril	57
2.3.7 Análisis estadístico	57
2.4 Resultados	57
2.4.1 Efecto de diferentes criopreservantes en cultivos de cepas de <i>Lb. plantarum</i>	58
2.4.2 Re-hidratación de cultivos preservados de cepas de <i>Lb. plantarum</i>	64
2.4.3 Tolerancia de cultivos de cepas de <i>O. oeni</i> a procesos de preservación	65
2.4.4 Re-hidratación de cultivos preservados de cepas de <i>O. oeni</i>	66
2.5 Discusión.....	68
2.6 Conclusiones.....	71

CAPÍTULO 3: Análisis de la modificación del perfil de compuestos volátiles en vino Pinot noir incubado con cultivos de cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni*

3.1 Introducción	73
3.2 Objetivo	75
3.3 Materiales y Métodos.....	76
3.3.1 Aclimatación de cultivos	76
3.3.2 Ensayos de fermentación.....	76
3.3.3 Viabilidad celular y consumo de ácido L-málico	77
3.3.4 Determinación de concentraciones de ácidos orgánicos	77
3.3.5 Micro-extracción en fase sólida con <i>headspace</i> (HS-SPME)	78

3.3.6 Cromatografía gaseosa – Análisis por espectrometría de masas	78
3.3.7 Reproducibilidad de los resultados.....	80
3.4 Resultados.....	80
3.5 Discusión.....	85
3.6 Conclusiones.....	89

CAPÍTULO 4: Inducción de la FML en un vino Malbec no estéril por inoculación de cultivos simples o mixtos de cepas patagónicas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*

4.1 Introducción	90
4.2 Objetivo	93
4.3 Materiales y Métodos.....	93
4.3.1 Vino	93
4.3.2 Cepas de <i>O. oeni</i> y <i>Lb. plantarum</i>	93
4.3.3 Aclimatación de cultivos	93
4.3.4 Ensayos de vinificación a escala de laboratorio	94
4.3.5 Capacidad de implantación de los cultivos inoculados	94
4.3.6 Determinación de concentraciones de ácidos orgánicos	95
4.3.7 Micro extracción en fase sólida con <i>headspace</i> (HS-SPME)	95
4.3.8 Reproducibilidad de los resultados.....	95
4.4 Resultados.....	95
4.5 Discusión.....	105
4.6 Conclusiones.....	108

Conclusiones Generales110

Anexos

Anexo 1	112
1.1 Extracción de DNA bacteriano	112
1.2 Identificación de aislamientos mediante análisis ARDRA del gen 16S rRNA	112
1.3 Identificación de aislamientos mediante secuenciación del gen 16S rRNA.....	113
1.4 Tipificación genética mediante análisis RAPD-PCR (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).114	

1.4.1 Tipificación genética mediante análisis RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) – Control de implantación de cultivos inoculados.....	114
1.5 Construcción de dendogramas a partir de datos RAPD-PCR	116
Anexo 2	118
2.1 Microextracción en fase sólida	118
2.2 Cromatografía gaseosa	120
2.3 Construcción de curvas de calibración para compuestos volátiles.....	123
Bibliografía	128
Agradecimientos	148

Introducción General

Tesis Doctoral – Lic. Natalia S. Brizuela

1.1. La industria vitivinícola en Argentina

La Argentina se ha ubicado a la vanguardia de la industria vitivinícola gracias a sus sólidas bases en este sector. La producción y el consumo de vinos en el país se remontan a principios del siglo XVI, cuando los colonizadores españoles trajeron a América los primeros especímenes de *Vitis vinífera*. También revistió importancia su propagación por los sacerdotes católicos que cultivaban viñedos en los monasterios con el propósito de asegurar la producción de vino para celebrar las misas.

Durante el siglo XIX los inmigrantes europeos introdujeron nuevas técnicas de cultivo y otras variedades de cultivares que hallaron, en los valles andinos y en el Valle del Río Colorado, el hábitat ideal para su crecimiento. En el siglo XX la industria vitivinícola sufrió fuertes cambios que marcarían su rumbo futuro, pasando de la producción masiva para consumo interno a una producción de menor volumen y calidad superior, para competir a nivel internacional.

La superficie de viñedos argentinos se extiende a lo largo de 3.800 km (22° a 45° de latitud sur), desde la Cordillera de los Andes hasta la Pampa húmeda (Chapadmalal, Buenos Aires) y desde la Quebrada de Humahuaca (Jujuy), con viñedos a más de 3.300 metros sobre el nivel del mar, hasta Chubut, donde se ubica la bodega más austral del mundo (45° de latitud sur), en la localidad de Capitán Sarmiento. Enólogos e ingenieros agrónomos exploran nuevos horizontes en busca de vinos con diferente *terroir*, que permitan dar respuesta a las demandas de los consumidores por un conjunto de atributos, experiencias y sensaciones asociadas al mismo. Este ha sido el motivo de la reciente expansión de fronteras de la vitivinicultura argentina hacia el sur, norte, este y oeste, con viñedos que trepan la montaña o crecen en las húmedas y ventosas costas del Atlántico, un universo en expansión de apelaciones geográficas y de estilos.

La superficie sembrada con vides en Argentina alcanzó, al 31 de diciembre de 2018, las 218.233 ha (Informe Anual 2018, INV), superando en un 8,5% al área cultivada en el año 2000. Sin embargo, la cantidad de viñedos inscriptos en el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) es menor, ya que actualmente existen 23.931, es decir, 1249 menos que en 2000. La tendencia indica que las fincas son cada vez más

grandes; el tamaño promedio en 1990 era de 5,8 ha, en 2000 de 8,0 ha y en 2018 de 9,1 ha (Informe Anual 2018, INV). De las 23 provincias que componen territorialmente el país, 18 registran superficie cultivada con vides (Figura I.1.1). El 70,1% del total corresponde a Mendoza, el 21,4% a San Juan, el 3,6% a La Rioja, el 1,5% a Salta, el 1,3% a Catamarca, el 0,8% a Neuquén y el 0,7% a Río Negro, siendo estas siete provincias las que concentran la mayor superficie cultivada. El 0,5% restante se distribuye entre once provincias: Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Tucumán, San Luis, Chubut, Entre Ríos, Jujuy, Misiones, Santiago del Estero y Santa Fe. Desde 2008, se ha registrado una disminución en la superficie cultivada con vides en las tres provincias más importantes, y también en Río Negro. No obstante, ha crecido en otras provincias, principalmente en Salta, seguida por Catamarca y Neuquén.

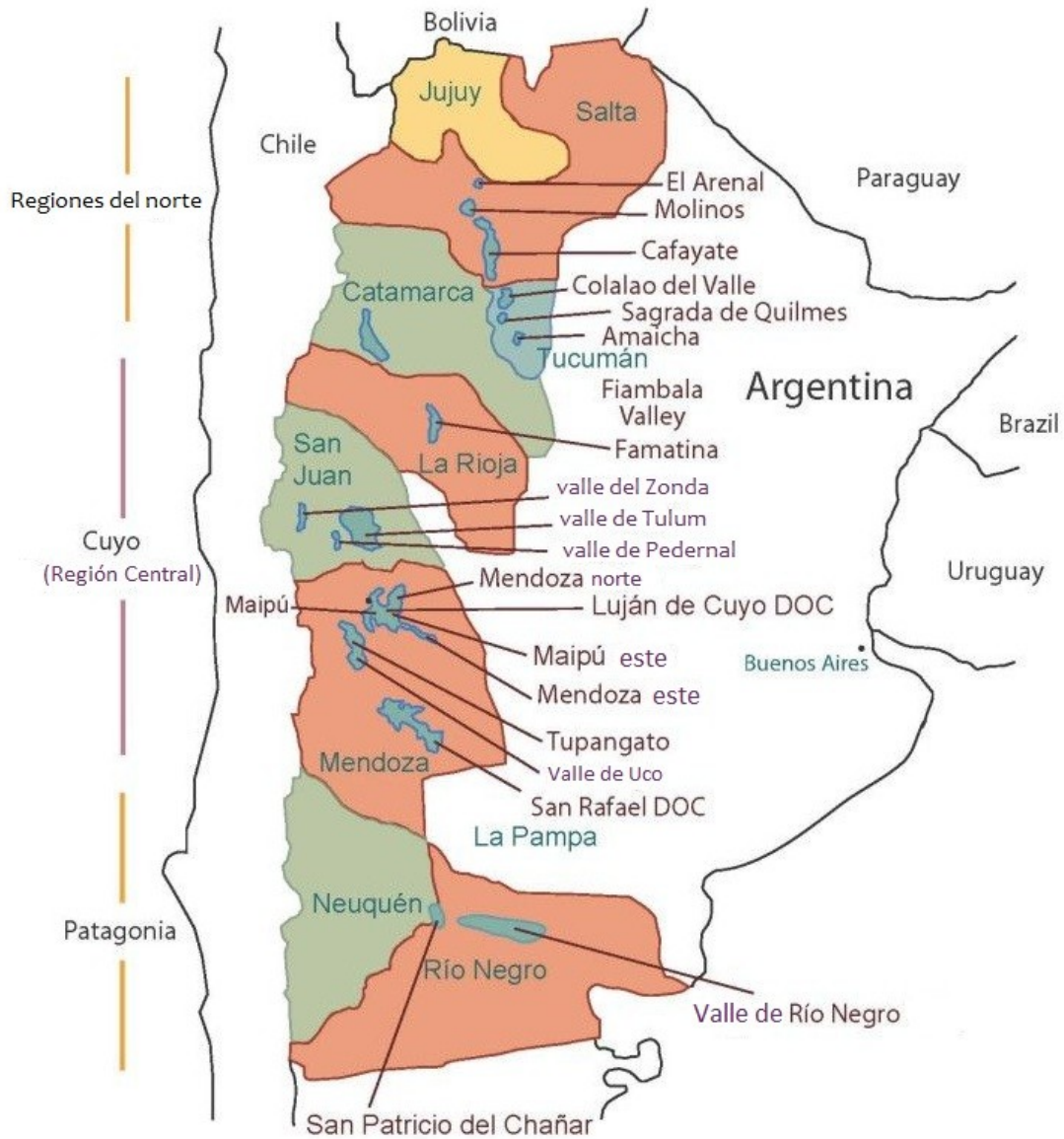


Figura I.1.1. – Regiones vitivinícolas Argentinas.

La producción vitivinícola argentina, correspondiente a la vendimia 2018, mostró los siguientes datos estadísticos: cosecha de uvas 25.733.114 quintales (1 qq = 0,1 t), elaboración de vinos 14.521.510 hl, elaboración de mostos 4.772.867 hl y elaboración de jugo de uva 1.631 hl (Informe Anual 2018, INV). El mercado interno representa el 80% de la comercialización del vino, y viene disminuyendo desde hace tres décadas, con el avance de la cerveza en la preferencia de los consumidores, constituyendo ésta

la principal problemática para el sector (Secretaría de Política Económica, Ministerio de Hacienda, Presidencia de la Nación, julio de 2018). En el comercio exterior, representa el 20% de las ventas, ya que Argentina ha perdido mercados desde 2011, vinculado tanto a aspectos macroeconómicos (atraso cambiario e incremento de costos internos), como al avance de algunos competidores –Australia y Chile- que acceden a los principales mercados en condiciones preferenciales. Sin embargo, si se comparan las exportaciones de vino fraccionado entre febrero de 2019 y febrero de 2018, la variación porcentual 2019/2018 resultó de +9,5%, y en las de vino a granel, de +171,0% (Anticipo Comercialización Mercado Externo de Vinos y Mostos, febrero 2019, INV).

Con relación a las variables vitivinícolas, Argentina es el 5º productor mundial de vino (Italia, Francia, España y Estados Unidos son los cuatro primeros), el 7º en superficie cultivada y producción de uva, el 8º en consumo y el 10º como exportador. Es decir que, en relación a la caracterización vitivinícola, Argentina se ubica entre los *top 10* del planeta. El excelente trabajo realizado por la industria vitivinícola en Argentina ha logrado instalar y referenciar la imagen del vino argentino en el mundo, por sus particularidades, perfiles regionales, varietales y calidad, con el Malbec como emblema destacado.

Los importantes cambios producidos en la industria y la comercialización del vino en los últimos treinta años, entre los que se destacan la enorme competencia internacional y un mercado nacional con sobreoferta, plantean la necesidad de atraer al consumidor buscando elementos diferenciadores de sus productos, como herramienta eficaz para distinguirse de sus competidores. Con este propósito, las bodegas han ido introduciendo modificaciones tecnológicas en la elaboración de los vinos, han recuperado variedades de uvas autóctonas de cada zona (Cereza, Criolla grande, Criolla chica, etc.) y han comenzado a reemplazar los cultivos comerciales de levaduras por levaduras indígenas, específicas de cada región vitivinícola, para lograr vinos distintivos, que aporten nuevas sensaciones a un consumidor cada vez más exigente.

1.1.2. Región vitivinícola Sur

La región vitivinícola Sur, ubicada en la Patagonia argentina, entre los 37 y 45º de latitud sur, es una vasta zona integrada por gran parte del territorio de las

provincias de Río Negro y Neuquén, sur de La Pampa y noroeste de Chubut. La superficie total cultivada con vides es de 3.731 ha (INV, estadística 2018), concentrándose el 90,7% de la producción en Neuquén y Río Negro (Figura I.1.2). A fines de 2018 (INV estadísticas 2018), las superficies cultivadas por provincia eran: Neuquén 1.765 ha, Río Negro 1.618 ha, La Pampa 275 ha y Chubut 73 ha. El sistema de conducción mayoritariamente empleado en estos viñedos es el de espaldera, y algo de parral. Las principales variedades tintas cultivadas para elaboración vínica son: Malbec, Merlot, Cabernet sauvignon y Pinot noir, variando su porcentaje según la provincia, en tanto que las blancas son Chardonnay y Sauvignon blanc. Estos varietales han encontrado en la región Sur las condiciones agroecológicas óptimas para expresar todo su potencial enológico.

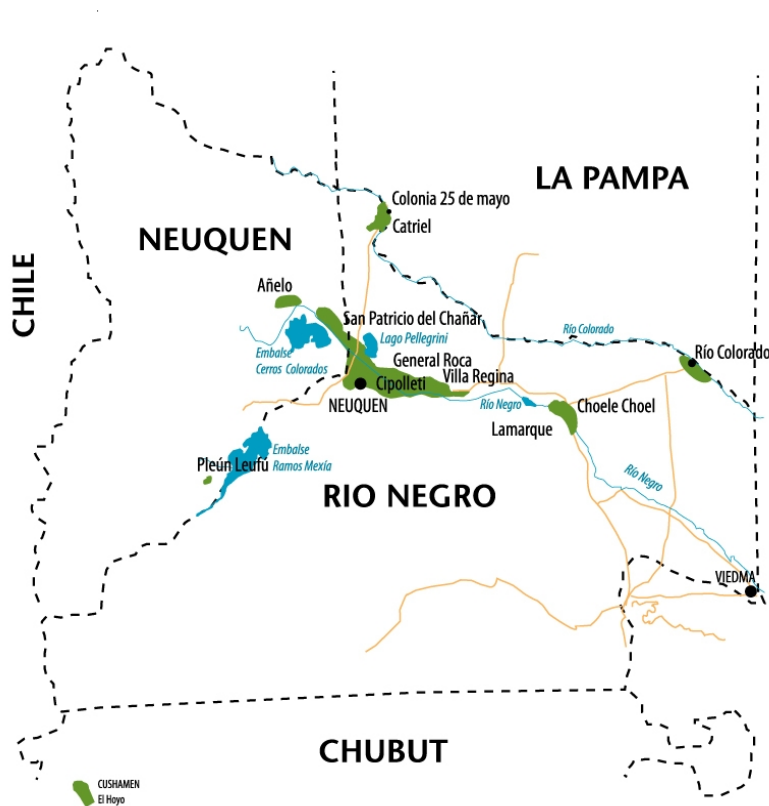


Figura I.1.2. – Área nor-patagónica de la Región Vitivinícola Sur

Por otra parte, la caracterización fisicoquímica de mostos patagónicos de uvas tintas puso en evidencia contenidos elevados de ácidos orgánicos fijos respecto de mostos similares de otras regiones del país, en particular de ácido L-málico

(Crisóstomo 2007). En mostos tintos el ácido L-málico puede alcanzar, en promedio, el 53% de la acidez titulable (36% de la acidez total), llegando a valores del 66% (45% de la acidez total) en la variedad Pinot noir (Crisóstomo 2007).

El varietal Pinot noir, originario de la región francesa de Borgoña, se caracteriza por presentar racimos pequeños, compactos, con bayas también pequeñas, esferoides y de color negro-azulado. A partir estas uvas se producen algunos de los vinos más elegantes del mundo, pero resulta una variedad difícil de cultivar y de vinificar. La piel fina de las uvas y sus bajos niveles de compuestos fenólicos llevan a producir vinos de color claro, cuerpo medio y pocos taninos, con excelente *bouquet*. Cuando estos vinos son jóvenes, poseen aromas a frutos rojos, como cerezas, frambuesas y frutillas. Si bien su color no es intenso, resulta atractivo, y varía de rojo suave, en vinos jóvenes, a anaranjado suave luego de 8 a 10 años de guarda y añejamiento. Constituye uno de los varietales empleados en la elaboración de vinos espumosos en la región de Champaña (Francia) y en otras regiones vinícolas. Es una de las variedades más delicadas, ya que pequeños cambios en el *terroir* producen diferencias importantes en la calidad del vino. Se cultiva en casi todas las provincias vitivinícolas de Argentina; en 2017 registró un total de 2.045 ha, que representaron el 0,9% del total de vid del país (INV, 2017, Informe Variedad Pinot noir). En el período 2008-2017 se produjo un incremento de 33,9% en la cantidad de ha sembradas con esta variedad. Mendoza tiene la mayor superficie (1.508 ha, 73,7%), seguida por Neuquén (233 ha, 11,4%) y Río Negro (133 ha, 6,5%), correspondiendo al resto de las provincias 171 ha (8,4%). La tendencia indica que la comercialización total de vinos varietales elaborados con Pinot noir creció, en los últimos 10 años, 2,4%. En 2017, se exportó el 66% de los vinos varietales elaborados con Pinot noir y el 34% se comercializó en el mercado interno.

1.1.3. Elaboración del vino

La vinificación se realiza a partir del mosto de uvas, que se fermenta junto con las partes sólidas de la misma (hollejo y pepitas). La calidad de la uva y su aptitud para ser fermentada varía principalmente con el clima. Es difícil conocer el

tiempo óptimo de maduración de las uvas, que deben tener un apropiado contenido de azúcares que posibilite su fermentación. Si la materia prima carece de suficiente nivel de azúcares, éstos pueden añadirse al mosto, de acuerdo con las normas y regulaciones propias del país, proceso que se conoce como capitalización. El *flavour* del vino, que abarca el sabor, el aroma y los atributos visuales (Polášková et al. 2008), dependerá de los aromas varietales (tipo de uvas), de los aromas desarrollados durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica (aromas fermentativos) y de las condiciones de envejecimiento/almacenamiento (aromas de envejecimiento), que conferirán el aroma final al producto terminado (Matheus et al. 2004).

Durante la vinificación se producen dos fermentaciones. La primaria, denominada fermentación alcohólica (FA) o “tumultuosa”, es conducida por las levaduras, encargadas de metabolizar los azúcares para convertirlos en etanol, con desprendimiento de anhídrido carbónico, al tiempo que los componentes colorantes del hollejo se disuelven en el mosto. Logrado el color se procede al “descube”, consistente en trasegar el líquido, separado de la materia sólida, a otro depósito o tanque donde se realizará la fermentación secundaria, denominada maloláctica (FML). No se trata de una verdadera fermentación sino de la conversión directa de un ácido dicarboxílico, como es el L-málico, en uno monocarboxílico, el L-láctico (Matheus 2004), reduciendo la acidez del vino, sus notas vegetales, reforzando el sabor afrutado y aportando a la complejidad organoléptica. Culminadas ambas fermentaciones, el vino se somete a diversos trasiegos y tratamientos de clarificación y estabilización, procesos que varían según el destino y tienden a conservar la limpidez del producto embotellado (Vogt et al. 1984).

1.2. Comunidad microbiana durante la fermentación vínica

El vino es una bebida alcohólica producida por fermentaciones de las uvas y representa una mezcla heterogénea de múltiples compuestos, que se liberan durante el proceso fermentativo y contribuyen a su color, aroma y sabor característico (Styger et al. 2011; González-Barreiro et al. 2015). La conversión

metabólica del mosto en vino es un proceso complejo que involucra una comunidad de microorganismos (Fugelsang & Edwards 2007). Las levaduras (sacaromicéticas y no-sacaromicéticas) juegan roles importantes durante la FA e impactan significativamente en la calidad del vino. Si bien las bacterias no constituyen la principal fuerza impulsora de las características y calidad del vino, tienen un efecto importante en el producto final. Las bacterias del ácido láctico (BAL) otorgan complejidad al *flavour*, mientras las bacterias del ácido acético (BAA) pueden causar deterioro del vino por producción de ácido acético. La FML, que en general ocurre después de la FA pero puede desarrollarse simultáneamente con ésta, resulta significativa por regular la desacidificación y la estabilidad microbiana. Dado que los microorganismos presentes en los diferentes estadios de la vinificación impactan, positiva o negativamente, en la calidad final del vino (Fleet 1993; Fugelsang & Edwards 2007), el monitoreo de los perfiles de la comunidad bacteriana durante la FA permitiría predecir y controlar dicha calidad de modo más eficiente. En años previos, y aplicando técnicas dependientes de cultivo, se identificaron diferentes microorganismos asociados a uvas y mostos (Cappello et al. 2004; Bae et al. 2006). Estos métodos microbiológicos convencionales facilitaron el aislamiento de numerosas levaduras (*Saccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Issatchenkia*, *Zygoascus* y *Zygosaccharomyces*) (Curtin et al. 2007; Barata et al. 2012; Di Toro et al. 2015), BAA (*Acetobacter* y *Gluconobacter*), y BAL (*Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*) (Beneduce et al. 2004; Bae et al. 2006; Capozzi et al. 2010; Bravo-Ferrada et al. 2011, 2013; Garofalo et al. 2015; Brizuela et al. 2017).

Dada la naturaleza viable no cultivable de muchos microorganismos del vino, o la dominancia de unos pocos que sobrecrecen en condiciones de laboratorio, los enfoques microbiológicos convencionales resultan en una imagen incompleta y sesgada de la comunidad microbiana involucrada en la fermentación vínica (Millet & Lonvaud-Funel 2000; Oliver 2005; Cocolin et al. 2013). Más recientemente, la técnica de PCR-DGGE, método independiente de cultivo, se empleó para detectar microorganismos presentes en diferentes estadios del

proceso de vinificación (Cocolin et al. 2000; Lopez et al. 2003; Spano et al. 2007; Renouf et al. 2007; Andorrà et al. 2008; Pérez-Martín et al. 2014; Valdés La Hens et al. 2015). Si bien constituye una herramienta útil para detectar y discriminar microorganismos potencialmente presentes en uvas y mostos, sin necesidad de cultivarlos, posee una capacidad limitada para brindar información completa de la biodiversidad de una muestra, dado que bandas electroforéticas asociadas con diferentes grupos filogenéticos podrían co-migrar y visualizarse como una banda simple, resultando en una sub-estimación de la diversidad de la comunidad (Laforgue et al. 2009; Cocolin et al. 2013).

El enfoque metagenómico, aplicando tecnología de secuenciación masiva o de nueva generación (*Next-Generation Sequencing* – NGS), constituye hoy una poderosa herramienta que permite examinar, con elevado rendimiento, comunidades microbianas complejas, incluyendo uvas, mostos y vinos. El análisis de la comunidad procariota se realiza por amplificación de regiones hipervariables del gen *16S-rRNA*, en tanto que el de la comunidad eucariota, por amplificación de la región espaciadora ribosomal ITS (Bokulich et al. 2012, 2014, 2015; Pinto et al. 2015). Sin embargo, aún resulta escaso el conocimiento de la dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación vínica y cómo diferentes factores ecológicos y prácticas de fermentación podrían afectar su composición. Una mejor comprensión de la dinámica microbiana y su efecto sobre el producto final resultan de gran importancia en enología para lograr producir estilos de vinos de calidad elevada y consistente.

1.2.1. Fermentación maloláctica (FML)

Como se mencionó anteriormente, numerosas transformaciones microbianas están involucradas en la vinificación, la cual conlleva una compleja sucesión de especies de levaduras y bacterias. En los primeros días de la FA, y dada su mejor adaptación a las condiciones del mosto, las levaduras invaden el medio de forma rápida, alcanzando elevadas poblaciones en poco tiempo (Ribereau-Gayon et al. 2003). En tanto las BAL, presentes en la uva en baja concentración, pueden multiplicarse de modo controlado. En la fase más activa de

la FA y hasta el agotamiento de los azúcares, las BAL entran en regresión, manteniéndose en latencia debido al activo crecimiento de levaduras y a los inhibidores producidos por éstas (ácidos grasos, etanol, anhídrido sulfuroso, etc.) (Lonvaud-Funel et al. 1988). La FML comienza cuando las bacterias mejor adaptadas al medio vino inician un crecimiento exponencial y su duración dependerá de las condiciones del vino y del tipo de vinificación (Ribereau-Gayon et al. 2003). A continuación, la población de bacterias alcanza una fase estacionaria, a la cual sigue una de declive. El sulfitado, realizado en este momento del proceso, reduce la población de BAL casi en su totalidad (Beneduce et al. 2004).

Por métodos dependientes de cultivo se observó que durante la vinificación ocurre una sucesión de especies de BAL. En las uvas y previo a la cosecha es habitual encontrar miembros del género *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii* y *Lb. casei*), en tanto en los mostos la microflora es más variada y, además de lactobacilos (*Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. fructivorans*), pueden hallarse pediococos (*P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*), *Leuconostoc mesenteroides* y *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel 1999). Durante la FML la diversidad de BAL se reduce al ocurrir una selección natural de especies, prevaleciendo algunas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* (Lonvaud-Funel 1999; Ruiz et al. 2010a) hacia el final de la misma.

Mientras la FA resulta esencial para la conversión del mosto en vino, la FML causa un ligero incremento del pH del vino, una disminución de su acidez titulable y un aumento de la estabilidad microbiana (Lonvaud-Funel 1999; Bauer & Dicks 2004; Betteridge et al. 2015). Esta reducción de la acidez es particularmente deseable en vinos producidos en regiones de climas fríos, como Nueva Zelanda, Canadá y sur de Argentina. La FML también influye positivamente en la modificación del aroma y sabor del vino, transformando los aromas herbáceos y produciendo compuestos aromáticos (Bartowsky 2005). Las rutas metabólicas que permiten a las BAL modular las características organolépticas del vino fueron descritas por Swiegers et al. (2005). Los metabolismos con mayor potencial incluyen los de citrato, aminoácidos, polisacáridos y polioles, el catabolismo de

aldehídos, la hidrólisis de glucósidos, la síntesis e hidrólisis de ésteres, la proteólisis y peptidólisis y la degradación de ácidos fenólicos (Liu 2002; Matthews et al. 2004). Estas reacciones dependen de la acción hidrolítica de enzimas bacterianas y los metabolitos formados pueden modificar positivamente las propiedades organolépticas y sensoriales del vino. Entre las de mayor interés se incluyen glicosidasas, β -glucosidasas, proteasas, esterasas, citrato-liasas y ácido fenólico decarboxilasas (Liu 2002; Matthews et al. 2004). Otras están involucradas en la modificación del color en vinos tintos y en la resolución de problemas asociados con la filtración de los mismos. Resulta importante comprobar el potencial de BAL enológicas en relación a la presencia de enzimas con capacidad de conferir características deseables al vino. Resumiendo, las modificaciones químicas y organolépticas que la FML es capaz de promover en el vino son:

- Descenso de la acidez total, con desaparición total o parcial del ácido L-málico y modificación de las sensaciones gustativas, que pasan de astringentes a suaves (Liu 2002).
- Débil incremento de la acidez volátil, por degradación del ácido cítrico en la etapa final de la FML, cuando el ácido L-málico ha desaparecido casi por completo (Ribereau-Gayon et al. 2003).
- Pérdida de la intensidad del color en vinos tintos, por decoloración de las antocianidinas debido al incremento de pH, y por procesos de precipitación y co-pigmentación (Lonvaud-Funel 1999).
- Modificación del aroma por incremento en la concentración de alcoholes superiores (isobutanol, 1-propanol, 1-butanol, alcohol isoamílico, etc.), ésteres (lactato de etilo, caproato de etilo, acetato isoamílico, etc.), ácidos (ácido acético, ácidos grasos, etc.) y otros compuestos como diacetilo o 2.3-butanodiol. Reducción de los aromas herbáceos y mejora de las propiedades sensoriales y la calidad de los vinos (Lonvaud-Funel 1999; Ugliano et al. 2003).
- Modificación del sabor por descenso de la acidez y reemplazo del ácido L-málico por ácido L-láctico, más suave y menos agresivo. Los vinos pierden

su carácter herbáceo, adquieren aromas frutales y se suavizan (Ribereau-Gayon et al. 2003).

- Incremento de la estabilidad biológica, por empobrecimiento del medio en nutrientes y factores de crecimiento y aumento de inhibidores microbianos (bacteriocinas, ácidos orgánicos, etc.) (Stiles & Holzapfel 1997) que otorgan al vino cierta inmunidad frente a microorganismos contaminantes (Lonvaud-Funel 1995).

1.2.2 Actividad maloláctica

La acidez de los vinos proviene de dos fuentes: los ácidos orgánicos de las uvas que pasan al mosto, predominando el tartárico, el L-málico y el cítrico (Boulton et al. 1996), y el metabolismo combinado de levaduras y bacterias durante la fermentación (Volschenk & van Vuuren 2006). Las levaduras producen principalmente ácido succínico y cantidades menores de ácidos participantes del ciclo de Krebs (CAT) (Ribereau-Gayon 2000). El ácido L-láctico es esencialmente producido por las BAL durante la FML, pero las levaduras pueden también aportar pequeñas cantidades (Volschenk & van Vuuren 2006). La reacción de decarboxilación del ácido L- málico es ligeramente exotérmica ($G=-8.3 \text{ kJmol}^{-1}$) y está catalizada por la enzima maloláctica, en presencia de los cofactores Mn^{2+} y NAD^+ . Implica la transformación directa del ácido L-málico en ácido L-láctico, sin la formación del ácido pirúvico como intermediario (Figura 1.2.2.1.) (Carrascosa et al. 2005).

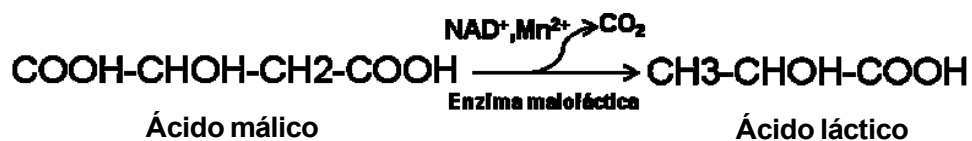


Figura 1.2.2.1- Reacción catalizada por la enzima maloláctica

En muchos vinos la especie bacteriana predominante al finalizar la FA es *O. oeni*, dadas las condiciones de bajo pH y elevada concentración de etanol (Carrascosa et al. 2005). En *O. oeni*, la enzima maloláctica está formada por dos subunidades

idénticas de 60 kDa y requiere de dos cofactores, NAD^+ y Mn^{2+} para activarse. Su forma activa es la dimérica y la transición monómero - dímero depende del pH (Battermann & Radler 1991). La reacción que cataliza es una óxido-reducción en la que interviene el NAD^+ y luego el NADH. Posee dos dominios de unión a NAD^+ , un dominio de unión a L-malato y un motivo de aminoácidos con una secuencia característica de las enzimas málicas (Labarre et al. 1996b). Funciona según un mecanismo secuencial ordenado por el cual los cofactores se fijan antes que el L-malato (Figura I.2.2.2) (Carrascosa et al. 2005).

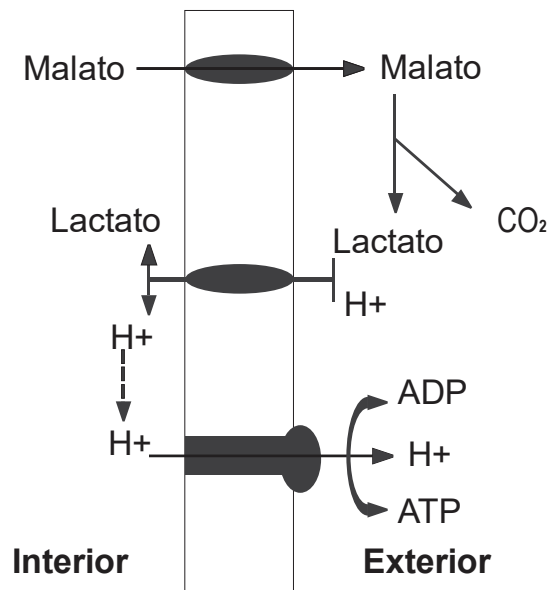


Figura I.2.2.2- Mecanismo de generación de energía metabólica a partir de la FML en BAL (adaptado de Carrascosa *et al.*, 2005)

La caracterización genética de la enzima maloláctica de *O. oeni* mostró que en el locus *mle* se encuentra el operón maloláctico compuesto por tres genes, *mleA*, que codifica la enzima maloláctica, *mleP*, que codifica la malato-permeasa y *mleR* que codifica el regulador que activa la transcripción del operón maloláctico (Labarre et al. 1996a) (Figura I.2.2.3).

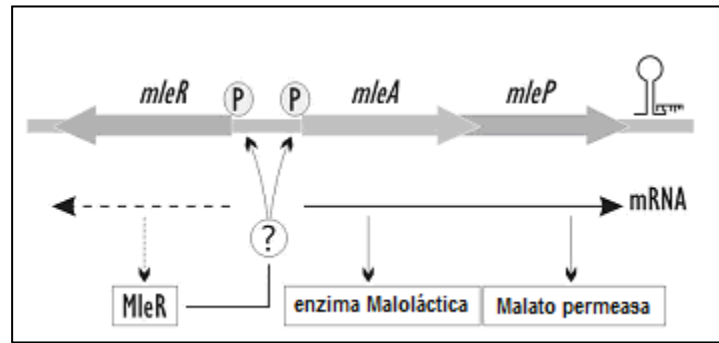


Figura I.2.2.3- Organización genética del operón *mle* de *O. oeni*

La expresión de la enzima maloláctica resulta inducida por la presencia de ácido L-málico, presente en mosto de uvas en concentraciones de 2 a 5 g/L para regiones frías o ~2 g/L para regiones cálidas. La expresión se incrementa a bajos valores de pH y disminuye con el incremento en la concentración de etanol. En vinos de regiones frías la concentración de etanol es de 11 a 14% v/v y puede alcanzar a 15% v/v en vinos de regiones cálidas (Miller et al. 2011). El mecanismo de ingreso del ácido L-málico a la célula en *O. oeni* consiste en uniporte del L-malato, que resulta rápidamente descarboxilado y los productos ácido L-láctico y CO_2 dejan la célula en un proceso electroneuro (Figura I.2.2.4) (Loubiere et al. 1992; Salema et al. 1994, 1996b, a).

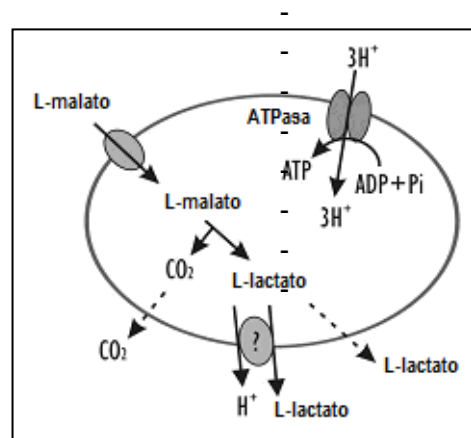


Figura I.2.2.4- Mecanismo de transporte del ácido L-málico en *O. oeni*. Descarboxilación seguida por extrusión de ácido L-láctico.

La FML comienza cuando la población bacteriana alcanza una concentración de 10^6 UFC/mL. Este crecimiento se favorece a $\text{pH} > 3.5$, contenido

de SO_2 inferior a 50 mg/L, concentración de etanol inferior a 13% v/v y temperaturas de 19 a 26 °C (Boulton et al. 1996). El proceso demora tiempos variables y finaliza cuando se reduce notablemente o se elimina el ácido L-málico (Carrascosa et al. 2005). Si las uvas tienen un pH elevado, las BAL pueden iniciar su multiplicación antes que finalice la FA, produciéndose el picado láctico de los azúcares junto con la metabolización del ácido L-málico, resultando en un incremento de la acidez volátil (Carrascosa et al. 2005). Una vinificación ideal supone la metabolización total de los azúcares por las levaduras previo al inicio de la FML, ya que en estas condiciones las bacterias se desarrollan metabolizando casi exclusivamente el ácido L-málico (Figura I.2.2.5) (Ribereau-Gayon et al. 2006).

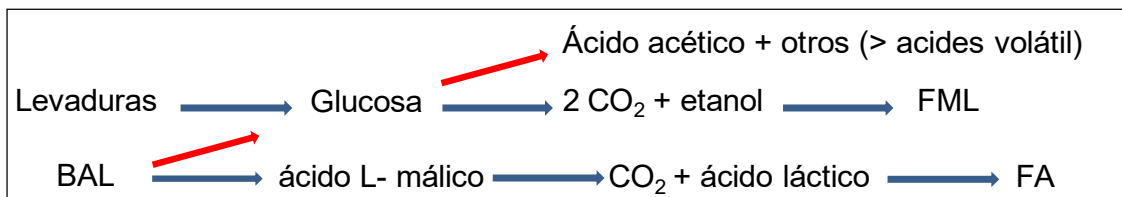


Figura I.2.2.5- Esquema del principio de vinificación ideal (→) y FML temprana (→)

Culminada la FML las BAL pueden convertirse en perjudiciales para el vino, por su capacidad de descomponer pentosas, glicerol, ácido tartárico y otros compuestos, incrementando la acidez volátil y la acidez total. El control de la biomasa láctica y de la contaminante se realiza por diferentes métodos (filtración, agregado de SO_2 o de inhibidores bacterianos autorizados como lisozima, nisina, ácido fumárico y otros) (Ribereau-Gayon et al. 2006).

En relación a *Lb. plantarum*, otra bacteria láctica con capacidad de conducir la FML, Caspritz & Radler (1983) purificaron y caracterizaron su enzima maloláctica, determinando un PM de 140.000 Da y que estaba constituida por dos subunidades de PM 70.000 Da. Al igual que en *O. oeni*, observaron que la reacción de descarboxilación directa del ácido L-málico para convertirlo en ácido láctico requería de dos cofactores, NAD^+ y Mn^{2+} . Por su parte, Olsen et al. (1991) analizaron el transporte del L-malato en *Lb. plantarum*, observando que era

inducible, a un pH óptimo de 4.5. También comprobaron que, a concentraciones de malato inferiores a 5 mM éste ingresa a la bacteria por simporte de H^+ , que el balance entre transporte de malato y eflujo de lactato es no electrogénico y que no se genera un ΔpH , siendo escasa la energía provista por la FML. Cuando el malato supera la concentración de 5 mM, el gradiente de malato sirve como fuerza impulsora para el transporte (difusión facilitada), se incrementa la estequiometría del simporte malato- H^+ , el ingreso de malato/eflujo de lactato se hace electrogénico, la disminución intracelular de H^+ crea un ΔpH y éste conduce a la síntesis de ATP.

Lb. plantarum se adapta bien a crecer en ambientes ácidos y esta tolerancia se manifiesta de diferentes formas. Como otros lactobacilos, permite que su pH intracelular disminuya en función del pH extracelular. A pH 4.5 se observa: i- la FML ocurre a tasa máxima, ii- el pH intracelular es el óptimo (6.0) para la enzima maloláctica, iii- se incrementa la actividad del *carrier* de malato, iv- predomina el malato, v- el potencial electrogénico es bajo, y vi- la bacteria transporta el malato por un mecanismo que no requiere potencial electrogénico (Olsen et al. 1991).

Miller et al. (2011) analizaron la expresión del gen *mle* en dos cepas de *Lb. plantarum*, 113.1 (colección del *Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University, South Africa*) y R1122 (control) (cepa comercial, Lallemand, Toulouse, France), en relación al pH y a las concentraciones de etanol y ácido L-málico, empleando vino sintético y vino, y aplicando la técnica de RT-qPCR. La comparación entre condiciones estrictas (pH 3.2, 15% v/v etanol) y no estrictas (pH 3.8, 0% v/v etanol), así como condiciones intermedias, les permitió determinar que la expresión del gen *mle* resultaba máxima al menor pH ensayado, en tanto que la presencia de etanol ejercía una influencia negativa, pese a que ambos factores de estrés (elevado etanol y bajo pH) fueron señalados por su efecto negativo sobre el crecimiento y la actividad metabólica de BAL (Vailiant et al. 1995; Gockowiak & Henschke 2003; Rojo-Bezares et al. 2007; Lerm et al. 2010). Beltramo et al. 2006, analizando la respuesta a estrés de *O. oeni* en vino sintético, mostraron que a pH ácido (3.5 comparado con 5.3) la expresión del gen *mle* resultaba incrementada, en consonancia con lo observado por (Miller et al. 2011).

Este incremento de la expresión en medio ácido podría relacionarse al rol de la FML en la regulación del pH intracelular bacteriano, otorgando a las BAL una ventaja biológica bajo condiciones de estrés ácido. También se demostró que la enzima maloláctica es inducible por ácido L-málico (Lonvaud-Funel 1995), y Miller et al. (2011) observaron que la expresión del gen *mle* era muy inferior hacia el final de la FML que en la etapa media. Esto resulta de importancia práctica, ya que podría significar que la FML no se completaría en vinos con bajos niveles de ácido L-málico, como 0.8 g/L (Miller et al. 2011).

1.3. Cultivos iniciadores de fermentación

Los cultivos iniciadores o *starter* constituyen un nivel de innovación fundamental para el sector vitivinícola. Cepas seleccionadas de levaduras (sacaromicéticas y no-sacaromicéticas) se emplean de modo rutinario con el propósito de lograr la biomasa necesaria para conducir y acelerar la FA del mosto. En el caso de los iniciadores malolácticos, su desarrollo y empleo depende de la caracterización, propagación y conservación de cepas de BAL adecuadas para tal fin. La selección de nuevas cepas, la renovación en el manejo y conocimiento de los recursos microbianos con nuevas tecnologías, posibilitan mejoras continuas en enología, capaces de incrementar los aspectos benéficos del vino. Dado que la FML ocurre generalmente luego de la FA, la proliferación de BAL y la eficiencia de este proceso resultarán afectadas por la composición del vino. Como se mencionó, la producción y liberación de etanol, SO₂, ácidos grasos, péptidos, polisacáridos y otras moléculas por parte de las levaduras, alterarán el crecimiento bacteriano y el normal desarrollo de la FML. Además, y dado que diferentes cepas de levaduras varían en su demanda de nutrientes, la disponibilidad de éstos para las BAL también influirá en la progresión de la FML; una baja demanda de nutrientes por las levaduras tenderá a favorecer la eficiencia de la FML (Guilloux-Benatier et al. 1998).

La FML y el metabolismo de las BAL de vino han sido extensivamente estudiados (Davis et al. 1986; Lonvaud-Funel 1999; Liu 2002; Bartowsky 2005; Swiegers et al. 2005). Para una mejor comprensión de la expresión fenotípica

bacteriana, se aplicaron diversas técnicas moleculares al estudio de la diversidad genética de las BAL de vino (Bilhère et al. 2009; Cappello et al. 2010; Valdés La Hens et al. 2015). Si bien resulta posible controlar el inicio de la FML por inoculación de cepas seleccionadas de BAL, esta fermentación puede ocurrir de manera espontánea si las condiciones resultan favorables. El crecimiento de la población indígena de BAL de vino se relaciona con su diversa capacidad para utilizar azúcares, aminoácidos y tolerar distintos tipos de estrés (acidez, SO₂, elevada concentración de etanol y baja temperatura) (Ribereau-Gayon et al. 2006; Borneman et al. 2012). Sin embargo, la FML espontánea implica riesgos, como un considerable incremento en la acidez volátil, el consumo de azúcares residuales y la formación de metabolitos indeseables como aminas biogénicas (AB) y etilcarbamato (EC), que afectan la salud humana y conducen a vinos de baja calidad (Spano et al. 2010).

Las reacciones metabólicas secundarias que producen modificaciones en el *flavour* y calidad del vino dependen de la acción hidrolítica de enzimas y de los metabolitos resultantes de la actividad enzimática de BAL. Si bien son aún parciales los estudios sobre potencial genético de BAL enológicas respecto a genes codificantes de enzimas de interés en vinificación, se avanzó en la caracterización bioquímica y genética de estas bacterias, como manera de dilucidar la relación entre diversidad de BAL y características organolépticas del vino, con énfasis en la importancia del potencial enzimático bacteriano para la selección de cultivos iniciadores que realcen el *flavour* del vino.

En años recientes, la industria vitivinícola se orientó hacia el empleo de cultivos comerciales de cepas seleccionadas de BAL para promover una rápida y confiable bioconversión del ácido L-málico (Spano et al. 2010; Petruzzi et al. 2017).

Tabla I.3.1. Principales propiedades enológicas de algunos cultivos *starter* comerciales para FML.

Espece	Nombre comercial	Características de interés para vinificación	Empresa proveedora
<i>O. oeni</i>	Bactella Crescendo	Puede conducir la FML bajo difíciles condiciones de vinificación.	OenoFrance
<i>O. oeni</i>	Viniflora Oenos	Produce una cantidad media de diacetilo.	Christian Hansen
<i>O. oeni</i>	450 PreAc	Específico para vinos con elevados contenidos de etanol.	Laffort
<i>O. oeni</i>	Vitilactic Primeur	Seleccionado para conducir la FML de vinos tintos con facilidad y efectividad	Martin Vialatte
<i>O. oeni</i>	Lalvin VP41	Puede conducir la FML bajo difíciles condiciones de vinificación. Se reconoce por su contribución sensorial a aromas de frutos rojos, su tardía y lenta degradación del ácido cítrico y la muy baja producción de diacetilo.	Lallemand
<i>O. oeni</i>	Ey2D	Sugerido para la FML de vino blanco y seleccionado por su tolerancia a bajas temperaturas de vinificación.	Wyeast
<i>O. oeni</i>	Bi-Start Vitale SK11	Realza el carácter típico del vino tinto con sabores pronunciados de mermelada, cereza o pimentón maduro.	Erbslöh
<i>O. oeni</i>	WLP675	Produce niveles moderados de diacetilo. Tiene elevada tolerancia al pH bajo (3.0), la baja temperatura ambiente (<15 °C) y alto porcentaje de etanol (hasta 15% v/v)	Witner's Harvest
<i>O. oeni</i>	Sihalact Oeno	Produce baja concentración de diacetilo y tolera un elevado porcentaje de etanol (hasta 15% v/v).	Begerow
<i>O. oeni</i>	ML One	Produce aromas limpios y frutales y ayuda a reducir el impacto de las notas herbáceas que a veces están presentes en vinos tintos.	Enartis
<i>Lb. plantarum</i>	Viniflora Nova	Resulta ideal para mostos con bajo contenido de ácido L-málico. Incrementa los aromas y sabores frutales, especialmente los atributos a frutos rojos.	Christian Hansen
<i>Lb. plantarum</i>	V22	Recomendado para mostos de elevado pH. La cepa demostró ser capaz de producir una alta expresión de aromas de frutos rojos en vino tinto. Puede degradar ocratoxina A en vino.	Lallemand
<i>Lb. plantarum</i>	ML prime	Recomendado para una FML rápida (3 a 5 días) y confiable en vinos de pH ácido (pH ≥3.4). Esta cepa convierte la glucosa o la fructosa solo en ácido láctico pero no en ácido acético, evitando así una mayor producción de acidez volátil durante la FML.	Lallemand
<i>Lb. plantarum</i> y <i>O. oeni</i>	Anchor Duet Soft	Mejora los aromas frutales en vinos mediante la producción de ésteres que reducen los caracteres herbáceos. Menor astringencia. Presenta más notas de frutos negros.	Anchor Yeast
<i>Lb. plantarum</i> y <i>O. oeni</i>	Anchor Duet Arom	Mejora el color en vinos tintos. Presenta más notas aromáticas de frutos rojos y notas especiadas más evidentes.	Anchor Yeast

La Tabla I.3.1 (Petruzzi et al. 2017) muestra algunos ejemplos de iniciadores malolácticos comerciales, detallando sus principales propiedades enológicas. Entre las especies de BAL, *O. oeni* es probablemente la mejor adaptada al ambiente hostil del vino (Bauer & Dicks 2004; Betteridge et al. 2015). Su actividad metabólica es capaz de mejorar las propiedades organolépticas del vino mediante la producción de diferentes metabolitos secundarios (Bartowsky 2005; Bartowsky & Borneman 2011). Sin embargo, la inducción de la FML con iniciadores comerciales de *O. oeni* no siempre resulta exitosa dadas las características estresantes del vino (Ruiz et al. 2010c). Al igual que lo ocurrido con la FA, la tendencia actual en enología está direccionada al empleo de iniciadores desarrollados con cepas bacterianas autóctonas, mejor adaptadas a las condiciones específicas de un área productora de vinos y capaces de mantener el *terroir* regional. Con este propósito se concretaron diferentes estudios de caracterización de la biodiversidad de *O. oeni* (Capozzi et al. 2010; Bordas et al. 2013; González-Arenzana et al. 2013; Valdés La Hens et al. 2015; Garofalo et al. 2015; Berbegal et al. 2017). Algunas especies del género *Lactobacillus* resultan capaces de sobrevivir en condiciones de vinificación y poseen propiedades biológicas que las convierten en candidatos adecuados para cultivos malolácticos (du Toit et al. 2011). Otras investigaciones se enfocaron en especies alternativas de BAL para conducir la FML, como *Lb. plantarum* (du Toit et al. 2011; Lerm et al. 2011; Bravo-Ferrada et al. 2013, 2014; Berbegal et al. 2016; Iorizzo et al. 2016; Lucio et al. 2016). Estas, pueden llevar a cabo varias reacciones metabólicas secundarias de importancia para mejorar las características organolépticas de los vinos (Liu 2002; Matheus et al. 2004), exhibiendo un mayor espectro de actividades enzimáticas que *O. oeni*, que pueden contribuir a modificaciones del perfil de compuestos volátiles.

Actualmente, la producción de eficientes cultivos malolácticos se ha convertido en uno de los principales desafíos de la investigación enológica (Lerm et al. 2011; Berbegal et al. 2016; Petruzzi et al. 2017). Varios criterios importantes deben abordarse en la selección de BAL para su posible empleo como cultivos iniciadores, tales como capacidad de tolerar bajo pH, elevados niveles de etanol y

SO₂, baja temperatura, resistencia a bacteriófagos, buen crecimiento en condiciones de vinificación, compatibilidad con la/s cepa/s de levaduras seleccionadas, incapacidad de producir aminas biogénicas y olores o sabores desagradables (Ruiz et al. 2010b; Capozzi et al. 2010; Lerm et al. 2011). Otro aspecto es la susceptibilidad de las BAL a los polifenoles contenidos en el vino.

El diseño de iniciadores malolácticos nativos, capaces de mantener el *terroir* regional, comienza con la definición de las características del vino a elaborar y el aislamiento, identificación, caracterización y selección de cepas bacterianas obtenidas de FML espontáneas y exitosas de vinos de la región (Ruiz et al. 2010a). Dicha selección parte de un número elevado de cepas/especies que se someterán, en un principio, a criterios de fácil evaluación, que permitan descartar las menos interesantes, reduciendo el número a estudiar en las siguientes etapas, en las que se abordarán análisis más complejos. Los criterios empleados en la selección de cepas BAL se relacionan con propiedades tecnológicas y enológicas y se refieren a:

- Capacidad de tolerar las estresantes condiciones del vino durante la etapa de FML (bajo pH, elevadas concentraciones de etanol y sulfito, baja temperatura) (Guzzo et al. 2000; Alexandre et al. 2004; Spano & Massa 2006).
- Resistencia a la conservación mediante liofilización y congelación (G-Alegría et al. 2004; Alexandre et al. 2004).
- Incapacidad de producir compuestos indeseables, como aminas biogénicas o etilcarbamato (Fiocco et al. 2007).
- Capacidad de desarrollar diversas reacciones metabólicas secundarias que mejoren propiedades enológicas deseables.

La elaboración de iniciadores malolácticos autóctonos tiene gran impacto sobre el sector productivo y la economía regional. La posibilidad de transferir esta tecnología al sector dependerá, en parte, del éxito alcanzado en las distintas etapas de desarrollo de los *starter* que, una vez seleccionadas las cepas, incluyen la obtención de biomasa a bajo costo, la optimización de la preservación de cultivos, la caracterización del comportamiento a escala piloto y su validación en

entorno relevante. En el caso particular de los vinos tintos patagónicos, en la mayoría de las bodegas la FML transcurre de manera espontánea, guiada por la población nativa de BAL. Este proceso resulta impredecible, especialmente cuando la temperatura ambiente es baja, razón por la cual resulta recomendable disponer de cultivos indígenas que aseguren un desarrollo exitoso, manteniendo las características del *terroir* regional y el logro de vinos de calidad, con características organolépticas específicas.

1.4. Estudios de BAL nativas de vinos tintos patagónicos

En el Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM), perteneciente al Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), Departamento de Ciencia y Tecnología - UNQ, se trabaja en BAL de origen enológico desde el año 2008. A partir de muestras de vinificaciones de *Vitis vinifera* varietal Pinot noir, cosechas 2008, 2010, 2011 y 2012, procedentes de una antigua bodega comercial ubicada en el Alto Valle del Río Negro, y correspondientes a diferentes etapas de FML espontáneas, se aislaron, identificaron y caracterizaron diferentes BAL (Bravo-Ferrada et al. 2011, 2013; Brizuela et al. 2017).

También se abordaron estudios de diversidad de especies de BAL en vinos patagónicos de las variedades Pinot noir (cosechas 2010 y 2012) y Merlot (cosechas 2008 y 2012), aplicando la técnica de PCR-DGGE, independiente de cultivo, utilizando como marcadores genómicos la región variable V3 del gen *16S rRNA* y el gen de mantenimiento *rpoB*, para lograr así una descripción más completa de la diversidad de BAL (Valdés La Hens et al. 2015). Las muestras se recolectaron al final de la FA (inicio FML), y en los días 14 y 35 de la FML. Sólo en los vinos Merlot 2008 la FA se condujo por inoculación con el cultivo comercial *S. cerevisiae* F15 Laffort (Burdeos, Francia). En las vinificaciones restantes, la FA fueron espontáneas y además, la bodega patagónica muestreada nunca utilizó iniciadores malolácticos comerciales.

En el caso de las muestras de vino Pinot noir, el uso combinado de estas dos regiones genéticas permitió identificar varias especies de *Lactobacillus*,

Pediococcus, *Lactococcus* y *O. oeni*. Al inicio de la FML se observaron dos especies de *Bacillus*, *B. circulans* y *B. subtilis*, que podrían ser el resultado de una contaminación con suelo. Las especies *O. oeni*, *Lb. plantarum*, *Lb. guizhouensis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* y *P. ethanolidurans* se detectaron en todas las etapas de FML (Figura I.4.1 a) y b). Curiosamente, *Lc. lactis* sólo se detectó en vinos Pinot noir, y rara vez se ha encontrado en otros vinos y en uvas.

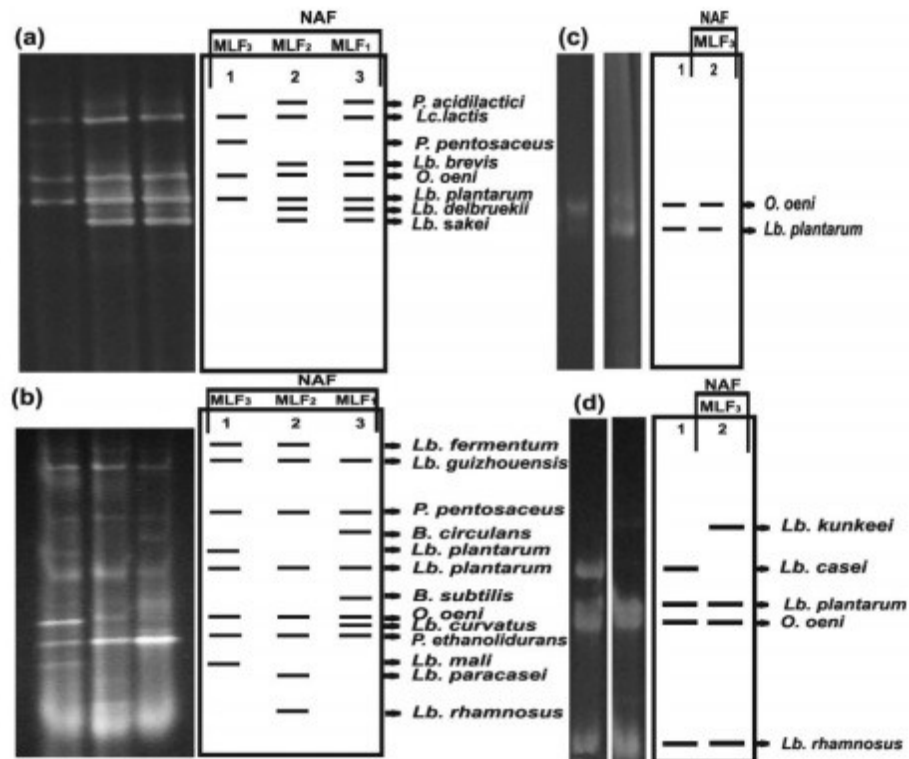


Figura I.4.1. Perfiles electroforéticos PCR-DGGE de especies de BAL asociadas a muestras de vino Pinot noir (cosechas 2010 y 2012) en diferentes etapas de la FA natural-FML (FAN-FML). (a) PCR-*rpoB*/ DGGE de vino Pinot noir 2010: 1 a 3, tres etapas de FML; (b) PCR-16S *rRNA V3*/ DGGE de vino Pinot noir 2010: 1 a 3, tres etapas FML. (c) PCR-*rpoB*/ DGGE de vino Pinot noir 2012; 1: cepas control de *Lb. plantarum* y *O. oeni* y 2: etapa final de la FML; (d) PCR-16S *rRNA V3*/ DGGE de vino Pinot noir 2012: 1: Cepas control de *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* y *O. oeni*; y 2: etapa final de la FML (Valdés La Hens et al. 2015).

Las especies *O. oeni* y *Lb. plantarum* también se detectaron en las tres etapas de FML de muestras de vino Merlot. En concordancia con estos resultados, González-Arenzana et al. (2013), mediante PCR-DGGE con la región variable V4-

V5 del gen *16S rRNA* y el gen *rpoB*, detectaron trece especies de BAL (nueve con la región V4-V5 del gen *16S rRNA*, y cuatro con el gen *rpoB*), muchas de las cuales también se detectaron en los vinos patagónicos. La prevalencia de *O. oeni* y *Lb. plantarum* en todas las etapas de FML muestreadas, sugiere que en los vinos Pinot noir y Merlot patagónicos, ambas especies están involucradas en liderar las FML espontáneas.

El análisis de heterogeneidad genética de estas especies mayoritarias (*Lb. plantarum* y *O. oeni*), mediante perfiles RAPD-PCR obtenidos con el primer Coc y aplicados a 30 aislamientos de cada especie, permitió agruparlos en *clusters* y simplificar la evaluación posterior de los mismos. Los biotipos discriminados, tanto para *Lb. plantarum* como para *O. oeni*, contenidos en una única muestra de vino, sugieren una notable diversidad intra-específica para ambas especies de BAL. Estos resultados concuerdan con resultados de otros autores, que además hallaron mayor diversidad intra-específica en cepas de *Lb. plantarum* respecto de *O. oeni* (López et al. 2008; Berbegal et al. 2016). Estudios similares, utilizando PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), confirman la presencia de diferentes cepas de la misma especie de BAL en una única FML espontánea (Ruiz et al. 2008; Solieri et al. 2010; González-Arenzana et al. 2012).

Otros estudios realizados en el LMM permitieron aislar e identificar más de 150 cepas enológicas de las especies *Lb. plantarum* y *O. oeni*. Mediante análisis de heterogeneidad genética se eligieron aislamientos pertenecientes a diferentes *clusters* y a muestras de vino de distintas vendimias, y se analizaron características enológicas y tecnológicas de interés en vinificación. Por ejemplo, se estudió la tolerancia a factores de estrés (acidez, etanol, lisozima y sulfito) con el propósito de seleccionar las cepas más aptas como posibles iniciadores de la FML. También se analizaron algunas actividades enzimáticas (β -glucosidasa, tanasa, consumo de citrato), y se constató la ausencia de genes responsables de la producción de aminas biogénicas, buscando particularmente los genes *hdc* (histidina decarboxilasa), *tdc* (tirosina decarboxilasa) y *ptcA* (putrescina carbamoil transferasa). Las actividades enzimáticas verificadas en diferentes cepas sugiere que su empleo como cultivos malolácticos permitiría obtener vinos con

características sensoriales diferenciales y de calidad controlada (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2016; Brizuela et al. 2017).



Objetivos

Considerando estos antecedentes de investigación, resulta relevante estudiar la capacidad de las cepas patagónicas seleccionadas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*, como cultivos iniciadores para conducir la FML en vinos tintos. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Optimizar las condiciones de aclimatación, inoculación y fermentación en vino estéril.
- 2) Optimizar las condiciones de preservación de cepas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*.
- 3) Analizar los compuestos volátiles producidos en un vino Pinot noir inoculado con cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y *O. oeni*.
- 4) Estudiar la capacidad de implantación de cepas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* en un vino Malbec y evaluar las modificaciones en el perfil de compuestos volátiles producidas por la fermentación maloláctica.

El propósito final es seleccionar las cepas mejor adaptadas a las condiciones de crecimiento en vino y con mayor impacto en las propiedades organolépticas del mismo, asegurando una calidad controlada y diferencial, que incremente el valor agregado de los vinos tintos patagónicos.

Capítulo 1

Optimización de las condiciones de aclimatación, inoculación y fermentación en vino estéril

1.1. INTRODUCCION

Oenococcus oeni y *Lactobacillus plantarum* han sido descritas como las especies de BAL mejor adaptadas para conducir la FML (Wibowo et al. 1985; Lonvaud-Funel 1999; Bartowsky & Henschke 1999; Pozo-Bayón et al. 2005; Valdés La Hens et al. 2015). La FML puede ocurrir de forma espontánea; sin embargo, implica riesgos como incremento en la acidez volátil, consumo de azúcares residuales, formación de metabolitos indeseables, incompatibilidad con las levaduras que conducen la FA y mayor duración del proceso. Por estas razones, muchos enólogos prefieren emplear cultivos iniciadores, evitando el retraso de esta fermentación secundaria y el eventual deterioro del vino (Ribereau-Gayon et al. 2006; Cecconi et al. 2009; Capozzi et al. 2010). Si bien existen cepas de *O. oeni* y *Lb. plantarum* disponibles como cultivos comerciales, tal como se mostró en la Introducción General, en la actualidad se recomienda el uso de cepas autóctonas, que permitan mantener las características del *terroir* (López et al. 2008; du Toit et al. 2011; Garofalo et al. 2015; Berbegal et al. 2016). La selección de cepas nativas como posibles candidatos para cultivos malolácticos, requiere de su aislamiento, identificación y análisis de una serie de propiedades enológicas y tecnológicas, así como verificar su capacidad para crecer y consumir ácido L-málico en las condiciones estrictas del medio vino (G-Alegría et al. 2004; Spano et al. 2005).

En trabajos previos del LMM se aislaron y caracterizaron varias cepas de ambas especies de BAL y se analizaron sus propiedades enológicas y tecnológicas (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2014, 2015b, c, 2016; Brizuela et al. 2017). Mediante análisis de heterogeneidad genética de los aislamientos de cada especie, se eligieron miembros de los diferentes *clusters*, cuya identificación se verificó por amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA*, para luego realizar, en las cepas elegidas, los ensayos de caracterización enológica y tecnológica. Las cepas escogidas en esta etapa se listan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Datos relativos a las cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* elegidas.

Cepa	Género	N° Acceso GeneBank	Varietal	Vendimia	Condición de FA y FML	Referencia
UNQLp155	<i>Lb. plantarum</i>	KC652904	Pinot noir	2008	FA con F15 FML espontánea	Bravo-Ferrada et al., 2013
UNQLp133	<i>Lb. plantarum</i>	KC562905	Pinot noir	2008	FA con F15 FML espontánea	Bravo-Ferrada et al., 2013
UNQLp65.3	<i>Lb. plantarum</i>	KC679066	Pinot noir	2008	FA con F15 FML espontánea	Bravo-Ferrada et al., 2013
UNQLp11	<i>Lb. plantarum</i>	KU693340	Pinot noir	2012	FA y FML espontáneas	Brizuela et al., 2017
UNQLp22	<i>Lb. plantarum</i>	KU693341	Pinot noir	2012	FA y FML espontáneas	Brizuela et al., 2017
UNQOe31b	<i>O. oeni</i>	KU693339	Pinot noir	2012	FA y FML espontáneas	Brizuela et al., 2017
UNQOe6	<i>O. oeni</i>	KU693338	Pinot noir	2012	FA y FML espontáneas	Brizuela et al., 2017
UNQOe73.2	<i>O. oeni</i>	KC562903	Pinot noir	2008	FA con F15 FML espontánea	Bravo-Ferrada et al., 2011

F15 starter comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (Laffort SA, Bordeaux, France). **FFA**: final fermentación alcohólica.

Para seleccionar las cepas más adecuadas para conducir la FML, se analizó su tolerancia a factores de estrés presentes en el vino, como acidez, etanol, lisozima y sulfito; se estudiaron las actividades tanasa y β -glucosidasa, el consumo de citrato y la ausencia de genes vinculados a la síntesis de AB (Bravo-Ferrada et al. 2014, 2016). Por otra parte, se realizó una búsqueda de genes codificantes de enzimas involucradas en la producción de metabolitos que pueden contribuir al perfil aromático del vino, tales como β -glucosidasa, ácido fenólico descarboxilasa (PAD), citrato liasa (subunidad β) y prolina aminopeptidasa (PAP). Si bien la presencia de estos genes no garantiza su expresión durante la vinificación, su detección por PCR permite conocer el potencial de las bacterias para sintetizar enzimas relacionadas con la producción de compuestos aromáticos. Las cepas de

Lb. plantarum mostraron mayor presencia de estos genes, exhibiendo UNQLp11 y UNQLp22 los cuatro ensayados. Las cepas UNQOe31b y UNQOe6, de *O. oeni*, sólo contuvieron dos, el de citrato liasa y el de β -glucosidasa. Estos resultados concordaron con un *screening* genético de enzimas relacionadas con compuestos aromáticos, realizado en cepas sudafricanas de *O. oeni* y *Lb. plantarum* (Lerm et al. 2011) y con las actividades enzimáticas detectadas en otras cepas patagónicas de estas especies (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2016).

Diferentes parámetros fisicoquímicos y biológicos del vino, el consumo de los nutrientes del mosto por las levaduras durante la FA y las interacciones levaduras-bacterias pueden inhibir el crecimiento bacteriano y, en consecuencia, conducir al fracaso de la FML (Cecconi et al. 2009). Además del etanol, las levaduras producen ácidos grasos que inhiben el crecimiento de las BAL. El grado de inhibición dependerá de la concentración de ácidos grasos, de la longitud de su cadena y de la composición del medio (Lonvaud-Funel et al. 1988).

Por lo tanto, para que las BAL puedan sobrevivir a la re-introducción en este ambiente hostil sin que ocurra una notable reducción su viabilidad, resulta necesario someter a las bacterias a un proceso de aclimatación, que se describe como una etapa esencial para incrementar su tolerancia al etanol y al pH durante la vinificación (Maicas et al. 2000; Cecconi et al. 2009; Lerm et al. 2010; Solieri et al. 2010). Esta adaptación consiste en la adquisición de mecanismos de tolerancia que permitan a las bacterias regular su pH intracelular para mantener activa la maquinaria metabólica celular. También implica una modificación en la composición de la membrana plasmática celular, de su fluidez, así como la síntesis de proteínas de estrés. Varios autores han propuesto métodos de aclimatación de cultivos; no obstante esto, los enólogos pueden optar por elaborar sus propios medios de aclimatación. Los mismos deben contener jugo de uva o de manzana, complementado con otros nutrientes, como extracto de levadura, peptona y Tween 80 (Pilone & Kunkee 1972, Kunkee 1974, Costello et al. 1983, Martineau & Henick-Kling 1995). En otros casos, los cultivos iniciadores suelen prepararse en vino diluido, reduciendo el riesgo de contaminación microbiana e incrementando la tolerancia al etanol (Hayman & Monk 1982, Nault et al. 1995). La

pre-exposición de las bacterias a condiciones de estrés tiene efecto positivo sobre su supervivencia (Bourdineaud et al. 2003; Bravo-Ferrada et al. 2014, 2016). Los tratamientos más recomendados consisten en la incubación en medios de aclimatación con concentraciones sub-letales de etanol (6% y 10% v/v) (Bravo-Ferrada et al. 2014, 2016).

En trabajos previos del LMM – UNQ se demostró que cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* pueden mantenerse viables en vino sintético (5 g/L ácido tartárico, 4.5 g/L ácido L-málico, 0.6 g/L ácido acético, 2 g/L glucosa, 2 g/L fructosa, 14% v/v etanol, pH 3.5) si eran previamente aclimatadas en un medio rico, conteniendo elevadas concentraciones de fructosa y glucosa y baja concentración de etanol (6 ó 10% v/v a 28 °C) (Bravo-Ferrada et al. 2014, 2016). Los cultivos aclimatados mostraron, además, mejor capacidad de consumir el ácido L-málico. El proceso de adaptación se ha relacionado con modificaciones en la composición y propiedades de la membrana plasmática, por ejemplo, en la composición de ácidos grasos y en el perfil proteico (Silveira et al. 2004; Chu-Ky et al. 2005; Bravo-Ferrada et al. 2014, 2015b). Sin embargo, varias de las cepas patagónicas no resultaron capaces de sobrevivir cuando se las incubó en vino estéril y resultó necesario optimizar las condiciones de adaptación, especialmente considerando que los vinos tintos patagónicos suelen contener elevados niveles de etanol ($\geq 14\%$ v/v).

1.2. OBJETIVO

El objetivo del trabajo presentado en este Capítulo consistió en analizar los efectos sobre viabilidad celular y consumo de ácido L-málico, en vino estéril, de tratamientos de aclimatación y de concentración bacteriana inoculada de cepas nativas patagónicas de *Lb. plantarum* (UNQLp11, UNQLp22, UNQLp155, UNQLp133 y UNQLp65.3) y de *O. oeni* (UNQOe73.2, UNQOe31b, y UNQOe6).

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *O. oeni* y *Lb. plantarum* se obtuvieron de vinos Pinot noir, cosechas 2008 y 2012, a partir de FML espontáneas (Tabla 1.1). Las características del vino cosecha 2008, en etapa final de FA, eran: etanol 14,6% v/v, pH 3.78, acidez total 3,98 g/L, azúcares residuales <2.00 g/L y ácido L-málico 4,5 g/L. Las del vino cosecha 2012 eran: etanol 14.3% v/v, pH 3.75, ácido L-málico 0.5 g/L.

Las muestras se recolectaron asépticamente en una bodega comercial ubicada en General Roca, Río Negro, y se inocularon en MLO (Maicas et al. 2000) y en MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) (De Man et al. 1960) según la especie de BAL. Las placas se suplementaron con cicloheximida 100 mg/L para evitar el desarrollo de levaduras, y se incubaron en condiciones anaeróbicas (AnaeroPack, Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., Nueva York, NY), a 28 °C, durante 7 días o 48 h, respectivamente. Las cepas identificadas y elegidas, se cultivaron en caldo MLO (*O. oeni*) ó MRS (*Lb. plantarum*), respectivamente (Figura 1.3.1). Los cultivos se mantuvieron congelados a -20 °C en el caldo correspondiente suplementado con glicerol (30% v/v).

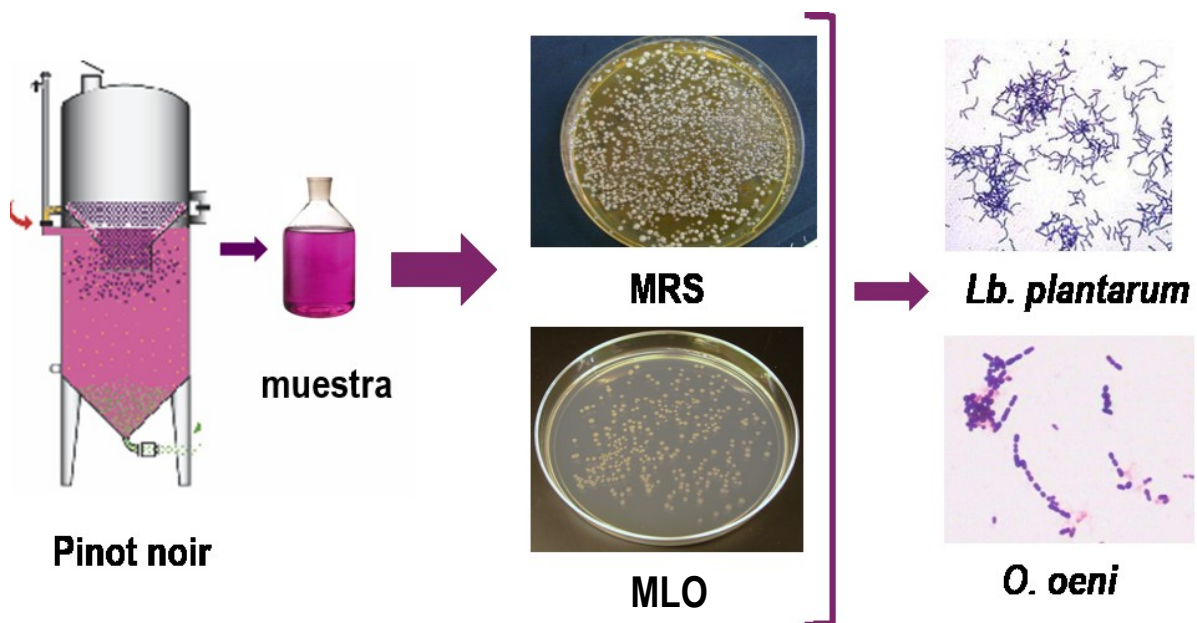


Figura 1.3.1. Esquema de aislamiento a partir de vino Pinot noir.

1.3.1.1. Composición de medios de cultivo

Medio de cultivo	Composición	Fuente
MRS	Peptona universal 10.0 g/L, extracto de carne 5.0 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L, D (+) glucosa 20.0 g/L, K ₂ HPO ₄ 2.0 g/L, Tween 80 1mL, citrato ácido de amonio 2.0 g/L, acetato de sodio 5.0 g/L, MgSO ₄ 0.1 g/L, MnSO ₄ 0.05 g/L. pH = 6,5 ± 0,1	De Man et al., 1960
MLO	Triptona 10,0 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L, glucosa 10,0 g/L, fructosa 5,0 g/L, MgSO ₄ 7H ₂ O 0,2 g/L, MnSO ₄ 4H ₂ O 0,05 g/L, citrato amónico dibásico 3,5 g/L, Tween 80 1mL, cisteína HCL 0,5 g/L, Jugo de tomate 100 mL/L. pH = 4,8	Maicas et al., 2000

1.3.2. Aclimatación de cultivos

Los cultivos en fase estacionaria temprana (aproximadamente 10⁹ UFC/ml) se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min y se resuspendieron en igual volumen de medio de aclimatación modificado.

Medio de cultivo	Composición	Fuente
Medio de aclimatación	MRS 50 g/L, D(-) Fructosa 40 g/L, D(-) Glucosa 20 g/L, ácido L-málico 4 g/L, Tween 80 1 g/L, Piridoxina 0,1 mg/L. pH = 4.6	(Lerm et al. 2011)

A este medio se le agregó etanol 6% ó 10 % v/v (Bravo-Ferrada et al. 2014). Las células, en el medio de aclimatación, se incubaron a 21 y 28 °C durante 48 h.

1.3.3. Recuento de bacterias viables

Se realizó en placas de MRS ó MLO, mediante la técnica de siembra diseñada por Miles et al. (1938) (Corral-Lugo et al. 2012). Se realizaron diluciones seriadas (1/10) en solución fisiológica con NaCl 0,9% p/v, como se observa en la Figura 1.3.3. Previo a la siembra en placa, las muestras de vino se diluyeron en solución fisiológica 10⁻³ a 10⁻⁸ veces, en función del recuento inicial, para obtener colonias

aisladas. De cada dilución se sembraron gotas de 10 μL . Las placas se incubaron en aerobiosis a 28 $^{\circ}\text{C}$, durante 48 h, para los cultivos de *Lb. plantarum* y por 7 días para los cultivos de *O. oeni*, y los resultados se informaron como UFC/mL.

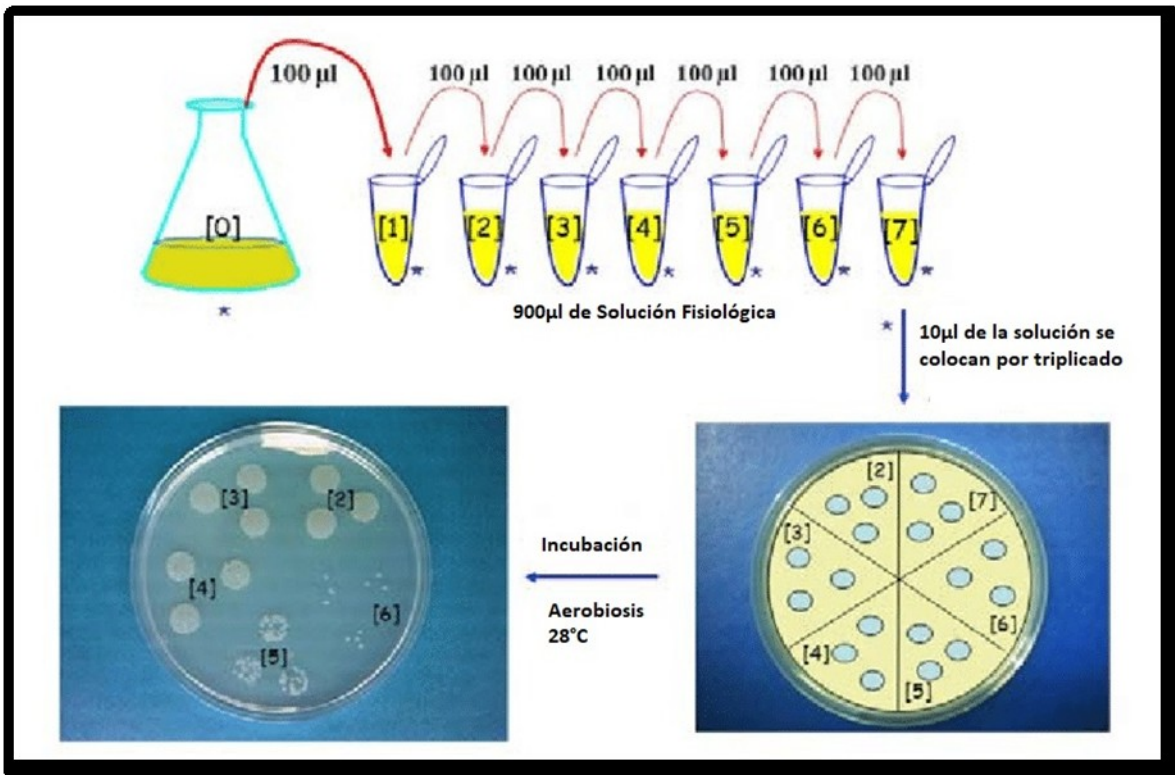


Figura 1.3.3. Técnica de recuento de bacterias viables

1.3.4. Fermentación en vino estéril

Se utilizó un vino Pinot noir cosecha 2014 en etapa final de FA (etanol 14.5% v/v, pH 3.82, <2.00 g/L de azúcares residuales, 2 g/L de ácido málico, 96 mg/L de SO_2 total). El mismo se esterilizó por filtración a través de membrana de 0.2 μm de tamaño de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemania). Las células de cultivos aclimatados y no aclimatadas (control) se recogieron por centrifugación y se inocularon ($\sim 5 \times 10^7$ UFC/mL) en 10 mL de vino, que se incubó a 21 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 días, sin agitación (Figura 1.3.4). En el caso de las cepas

UNQOe6, UNQOe31b y UNQOe73.2, se probaron otros tamaños de inóculo: $\sim 1 \times 10^8$, $\sim 1 \times 10^9$ y $\sim 1 \times 10^{10}$

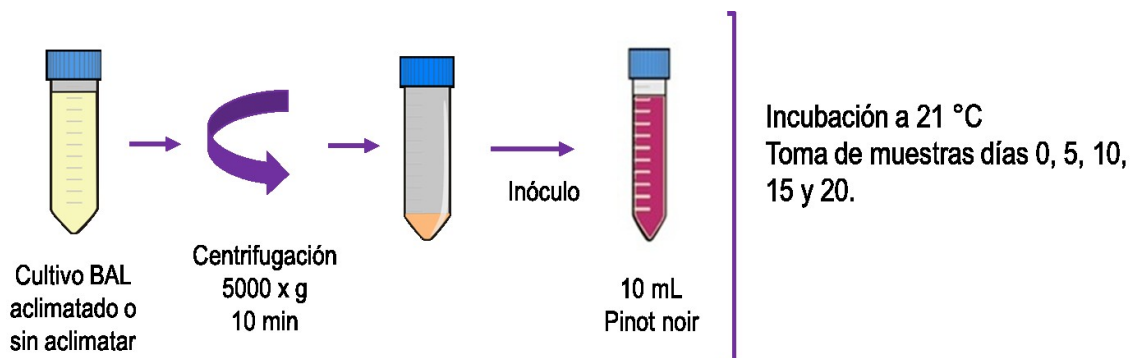


Figura 1.3.4. Esquema ensayo de vinificación

1.3.5. Consumo de ácido L-málico

Para evaluar el consumo de ácido L-málico (CAM), por cultivos acimatados y no acimatados, se utilizó un kit enzimático (kit ácido L-málico, BioSystems SA, Barcelona, España) y se determinó la concentración remanente del mismo, de acuerdo a las condiciones indicadas por el fabricante, adaptando los volúmenes de reactivos para medición en microplaca (Tabla 1.3.5.). La absorbancia a 340 nm, se leyó en microplaca, utilizando un equipo *Cytation 5 Imaging Reader, BioTek*. El ácido L-málico en la muestra genera NADH que puede medirse por espectrofotometría. El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de ácido L-málico. La enzima glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), desplaza el equilibrio eliminando el oxaloacetato, que se transforma en L-aspartato en presencia de L-glutamato.

Soluciones	Cantidad
Reactivo A	100 μ l
Reactivo B	25 μ l
Patrón	1,2 μ l
Blanco	1,2 μ l
Muestra	1,2 μ l

Tabla 1.3.5. Volúmenes del kit enzimático empleados para lecturas en microplaca

Durante la incubación en vino estéril se tomaron muestras los días 0, 5, 10, 15 y 20, con el propósito de evaluar la cinética de consumo de ácido L-málico en cada condición. Para ello se usó un modelo de decaimiento exponencial en una fase, aplicando la Ecuación 1 y utilizando el *software* GraphPad Prism® 6.0:

$$[MA_t] = ([MA_0] - [MA_i]) e^{-Kt} + [MA_i] \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde $[MA_t]$ es la concentración de ácido L-málico en el tiempo “t”, $[MA_0]$ es la concentración inicial de ácido L-málico (que fue ~2 g/L en el vino utilizado), $[MA_i]$ es la concentración de ácido L-málico a tiempo infinito (asíntota de la curva) y K es la constante de decaimiento exponencial.

Se determinó también el porcentaje de ácido L-málico consumido (CAM%) a los 20 días de incubación, aplicando la Ecuación 2:

$$\text{CAM \%} = 100 - ([MA_f] 100 / [MA_0]) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde $[MA_0]$ es la concentración inicial de ácido L-málico en el vino utilizado y $[MA_f]$ es la concentración final, medida en el vino después de 20 días de incubación.

1.3.6. Reproducibilidad de los resultados

Todos los experimentos se llevaron a cabo en muestras duplicadas, utilizando tres cultivos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, 2007). Los promedios se compararon mediante ANOVA de una vía, y si P resultó <0,05 la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

1.4. RESULTADOS

1.4.1. Ensayos de fermentación en vino Pinot noir estéril inoculado con cepas de *Lb. plantarum*

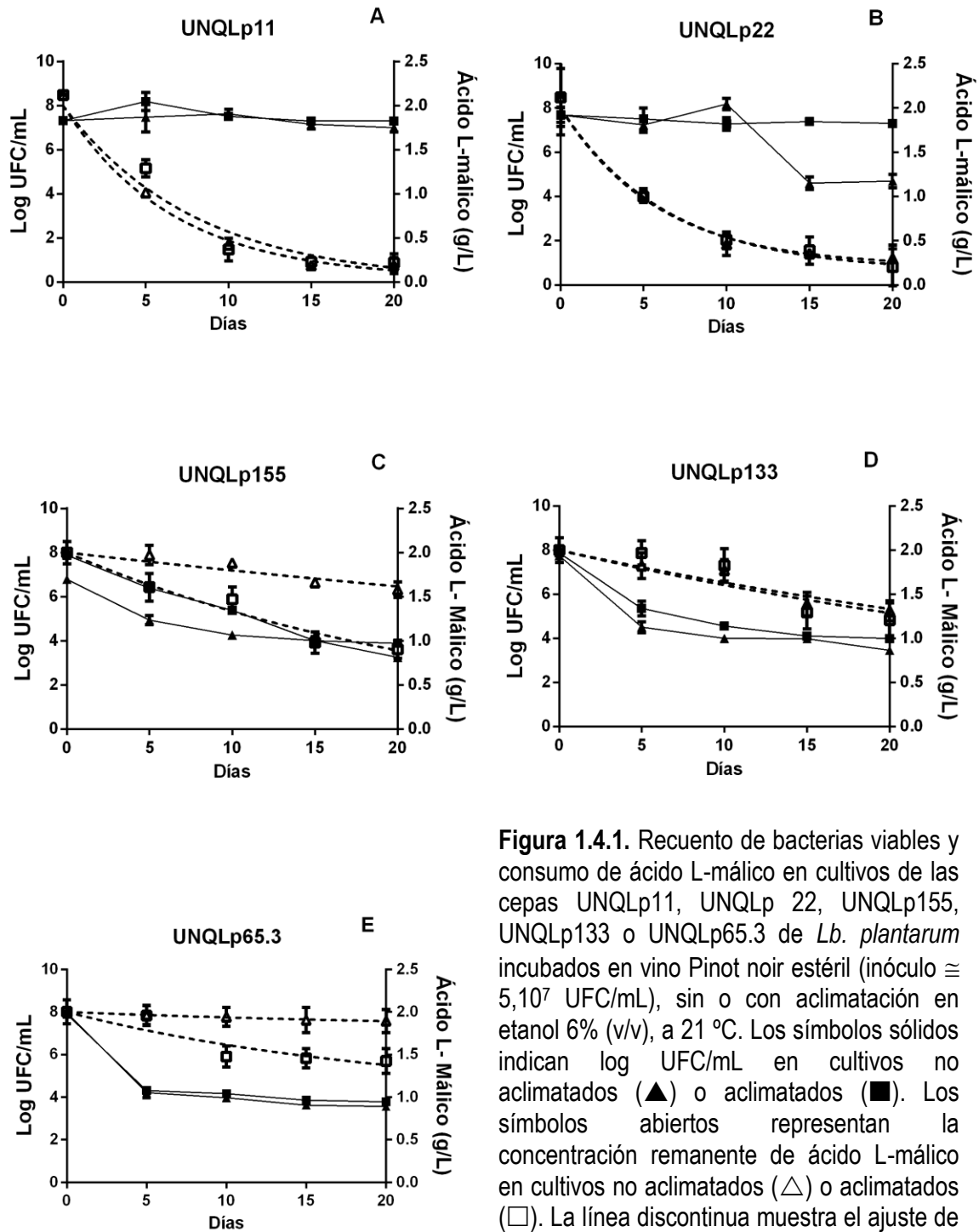


Figura 1.4.1. Recuento de bacterias viables y consumo de ácido L-málico en cultivos de las cepas UNQLp11, UNQLp 22, UNQLp155, UNQLp133 o UNQLp65.3 de *Lb. plantarum* incubados en vino Pinot noir estéril (inóculo $\cong 5, 10^7$ UFC/mL), sin o con aclimatación en etanol 6% (v/v), a 21 °C. Los símbolos sólidos indican log UFC/mL en cultivos no aclimatados (\blacktriangle) o aclimatados (\blacksquare). Los símbolos abiertos representan la concentración remanente de ácido L-málico en cultivos no aclimatados (\triangle) o aclimatados (\square). La línea discontinua muestra el ajuste de acuerdo con la Ecuación 1.

El efecto de la aclimatación previa de cultivos iniciadores de FML sobre su tolerancia al etanol ha sido estudiado por varios autores (Cecconi et al. 2009; Lerm et al. 2010; Solieri et al. 2010). En trabajos realizados en el LMM, se demostró que la aclimatación previa de cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* tenía un efecto positivo en su comportamiento en vino sintético (Bravo-Ferrada et al. 2014, 2015b, c, a, 2016). Sin embargo, no todas las condiciones de aclimatación ensayadas resultaron apropiadas para lograr la supervivencia de las cepas en vino estéril. En particular, se observó que una temperatura de aclimatación de 21 °C era más favorable que una de 28 °C y que la combinación de mayor temperatura de incubación con mayor porcentaje de etanol durante la aclimatación resultaba desfavorable para la supervivencia celular. En consecuencia, para los ensayos de fermentación en vino estéril, se descartó la temperatura de 28 °C y se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de etanol, así como la concentración de células a inocular en el vino estéril.

Los ensayos se realizaron en muestras de vino Pinot noir estéril (etanol 14.5% v/v, pH 3,82), que se inocularon con las cepas elegidas (Tabla 1.1), analizando la supervivencia y la cinética de consumo de ácido L-málico (CAM) en cada caso. La Figura 1.4.1 muestra la evolución en los valores de células viables y de CAM para los cultivos de cepas de *Lb. plantarum* (UNQLp11, UNQLp22, UNQLp155, UNQLp133 y UNQLp65.3). Se emplearon cultivos no aclimatados y aclimatados (etanol 6% v/v, 21 °C, 48 h). Se observó que la viabilidad de las cepas UNQLp11 y UNQLp22 se mantuvo relativamente constante durante el ensayo; en cambio, el cultivo no aclimatado de UNQLp22 disminuyó su concentración en 3 unidades log a los 20 días de incubación (Figura 1.4.1, A y B), indicando que la aclimatación mejora la supervivencia de esta cepa en el entorno vino. Las cepas UNQLp11 y UNQLp22 consumieron casi totalmente el ácido L-málico del vino estéril, a los 20 días (en todas las condiciones CAM resultó superior al 85%) y no se observaron diferencias significativas entre cultivos aclimatados o no aclimatados (Tabla 1.4.1). Por el contrario, con las cepas UNQLp155, UNQLp133 y UNQLp65.3 se observó un descenso de viabilidad de aproximadamente 2 unidades log en los primeros 5 días del ensayo (Figura 1.4.1, C, D y E), manteniéndose constante el recuento de

viables en los 15 días restantes. Los cultivos aclimatados no mostraron una clara mejora respecto de los cultivos sin aclimatar, si bien el cultivo aclimatado de la cepa UNQLp155 experimentó menor descenso de viabilidad que el no aclimatado. Al día 20, ninguno de estos cultivos logró consumir un gran porcentaje del ácido L-málico del vino, siendo el cultivo aclimatado de UNQLp155 el que mostró los mayores valores de CAM (54,78%). Sin embargo, en el análisis cinético de la Tabla 1.4.1, y de acuerdo a los valores de $[MA_i]$, las cepas UNQLp 155 y UNQLp 133 podrían resultar capaces de consumir la totalidad del ácido L-málico si se prolongara la incubación. La cepa UNQLp65.3 sin aclimatar consumió sólo el 5% del ácido L-málico a los 20 días, en tanto la aclimatada un 29%. De acuerdo al valor de MA_i (Tabla 1.4.1), la cepa UNQLp65.3 aclimatada podría llegar a consumir un 50% si se la incubara por mayor tiempo.

Tabla 1.4.1. Número de células viables de cepas de *Lb. plantarum*, antes y después de 20 días de incubación en vino de Pinot noir estéril, y parámetros cinéticos de consumo de ácido L-málico (Ecuación 1), obtenido de la Figura 1.4.1.

	UNQLp 11		UNQLp 22		UNQLp 155		UNQLp 133		UNQLp 65.3	
	Sin aclim	Aclim	Sin aclim	Aclim	Sin aclim	Aclim	Sin aclim	Aclim	Sin aclim	Aclim
N_0 (UFC/mL)	2.00E+07	2.00E+07	5.01E+07	5.01E+07	6.11E+06	7.53E+07	5.71E+07	7.57E+07	9.01+E07	7.72E+07
Log N/ N_0	-0.30	-0.02	-3.00	-0.30	-3.53	-3.98	-4.29	-3.88	-4.39	-4.11
CAM (%)	91.04 ± 3.12 ^a	89.62 ± 2.69 ^a	85.84 ± 1.68 ^a	90.57 ± 4.33 ^a	20.95 ± 4.38 ^d	54.78 ± 5.11 ^b	34.34 ± 5.71 ^{cd}	39.67 ± 9.905 ^{bc}	5.17 ± 4.725 ^c	28.83 ± 7.265 ^{cd}
K	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.01 ± 0.002	0.04 ± 0.007	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.08
R ²	0.9905	0.9600	0.9991	0.9916	0.8851	0.9618	0.9211	0.8127	0.9878	0.8451
[MA _i]	0.04	0.00	0.16	0.16	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	1.79	0.99

N_0 : Número inicial de viables (tiempo 0)

Log N/ N_0 : Cambio en el número de viables al día 20 de incubación.

CAM (%): Porcentaje de ácido L-málico consumido al día 20.

K: Constante de decaimiento exponencial de primer orden.

R²: Coeficiente de determinación.

[MA_i]: Concentración mínima de ácido L-málico (tiempo infinito).

Las diferentes letras (a, b...e) indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

1.4.2. Ensayos de fermentación en vino Pinot noir estéril inoculado con cepas de *O. oeni*

Cuando el vino estéril se inoculó con las cepas de *O. oeni* UNQOe6, UNQOe31b y UNQOe73.2, en iguales condiciones que los cultivos de cepas de *Lb. plantarum*, se observó una disminución drástica de la viabilidad celular (> a 4 unidades log) en los tres casos, a los 5 días de incubación (Figura 1.4.2.1 A, B, C). A partir de este momento los cultivos aclimatados comenzaron a crecer. Sin embargo, al día 20, el consumo de ácido L-málico resultó inferior al 40%.

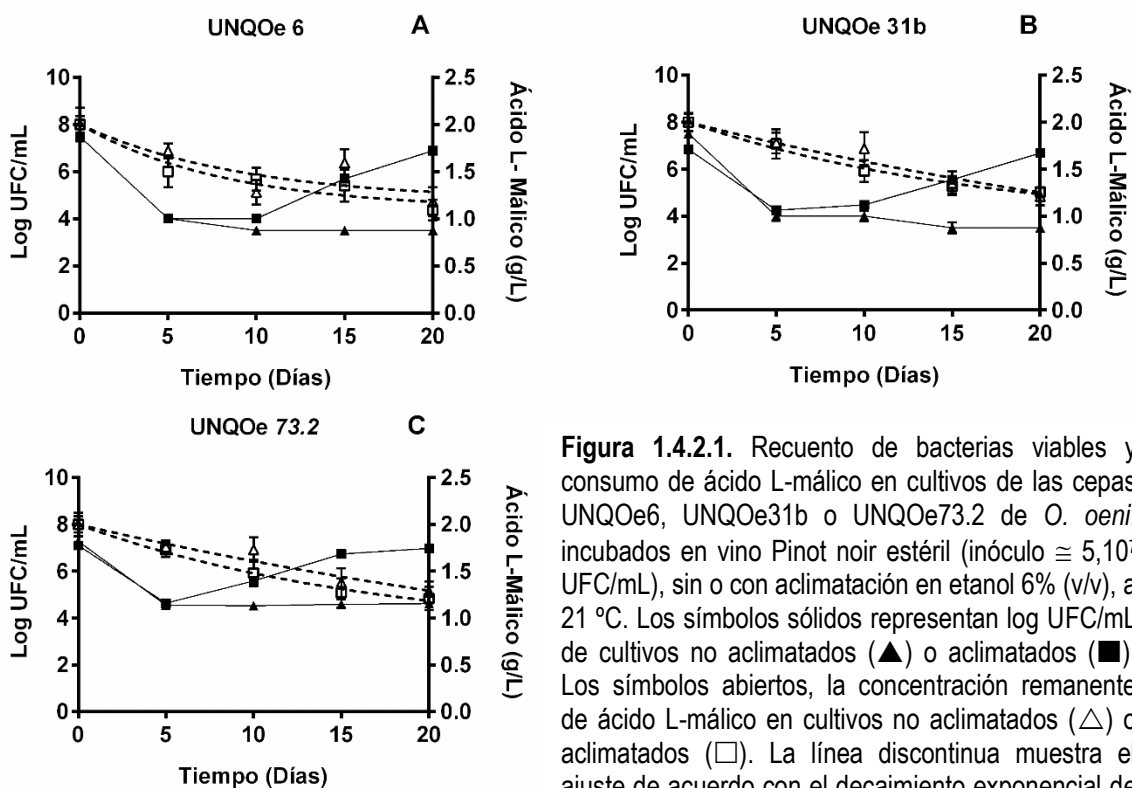


Figura 1.4.2.1. Recuento de bacterias viables y consumo de ácido L-málico en cultivos de las cepas UNQOe6, UNQOe31b o UNQOe73.2 de *O. oeni*, incubados en vino Pinot noir estéril (inóculo $\cong 5,10^7$ UFC/mL), sin o con aclimatación en etanol 6% (v/v), a 21 °C. Los símbolos sólidos representan log UFC/mL de cultivos no aclimatados (▲) o aclimatados (■). Los símbolos abiertos, la concentración remanente de ácido L-málico en cultivos no aclimatados (△) o aclimatados (□). La línea discontinua muestra el ajuste de acuerdo con el decaimiento exponencial de una fase según Ecuación 1.

Con el propósito de mejorar el consumo de ácido L-málico por parte de los cultivos de cepas de *O. oeni*, y considerando el inóculo utilizado por otros autores para este tipo de ensayos (du Toit et al. 2011), así como la pérdida de viabilidad exhibida en los 5 primeros días, se realizaron nuevos ensayos de fermentación

inoculando una mayor concentración bacteriana (Figura 1.4.2.2). En esta condición, se observó una mejor viabilidad de las 3 cepas de *O. oeni*, con mayor supervivencia en el caso de los cultivos aclimatados (Figura 1.4.2.2 A, B, C). También se constató una disminución significativa en la concentración del ácido L-málico remanente (mayor consumo) y un efecto positivo en los valores de CAM para las 3 cepas de *O. oeni* (Tabla 1.4.2). Los incrementos en estos valores, exhibidos por los cultivos aclimatados de cada cepa, resultaron los siguientes: UNQOe6 de 48 a 82,50%, UNQOe31b de 81.13 a 99.98%, y UNQOe73.2 de 84 a 100%. De las tres cepas de *O. oeni*, UNQOe31b y UNQOe73.2 mostraron mayor eficiencia como posibles cultivos iniciadores malolácticos que UNQOe6. Cuando el tamaño del inóculo se modificó a 1×10^8 UFC/mL (Figura 1.4.2.2 B, C), los cultivos aclimatados de UNQOe31b y UNQOe73.2 mostraron una eficiencia similar en el consumo del ácido L-málico que las cepas de *Lb. plantarum* UNQLp11 y UNQLp22 (Figura 1.4.1, Tabla 1.4.1). En base a estos resultados, se decidió continuar los estudios con las cepas UNQOe31b y UNQOe73.2 de *O. oeni*.

Considerando las diferencias de comportamiento observadas entre cultivos de *O. oeni* aclimatados y no aclimatados, y los resultados previos con respecto a la concentración de etanol en la aclimatación (Bravo-Ferrada et al. 2014, 2015b, c, a, 2016), se analizó el efecto de modificar la concentración bacteriana a inocular en el vino (1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} CFU/mL) y comparar los efectos de aclimatar las bacterias con dos concentraciones diferentes de etanol (6 ó 10% v/v). La Figura 1.4.2.3 muestra la viabilidad de los cultivos UNQOe31b y UNQOe73.2, aclimatados en etanol 6% y 10% v/v, y de los no aclimatados. La viabilidad de las células no aclimatadas disminuyó al inocularlas en el vino estéril y luego se mantuvo relativamente constante por 5 días, con la excepción del inóculo menor (Figura 1.4.2.3 A y D), para luego continuar disminuyendo hasta el día 10. Los cultivos aclimatados mantuvieron poblaciones celulares más elevadas que las no aclimatadas, al cabo de los 20 días del ensayo. De modo concordante, a mayor tamaño de inóculo, el CAM resultó superior y con una cinética más rápida (Figura 1.4.2.4). También se observó que, a mayor tamaño de inóculo, disminuyeron las diferencias de CAM entre cultivos aclimatados y no aclimatados. Con las tres

concentraciones inoculadas, el valor de CAM superó el 95% a los 20 días de incubación, pero sólo en los cultivos aclimatados. Asimismo, el incremento en la concentración de etanol mejoró los valores de CAM, siendo más notable en las condiciones de menor inóculo ($\sim 10^8$ UFC/mL).

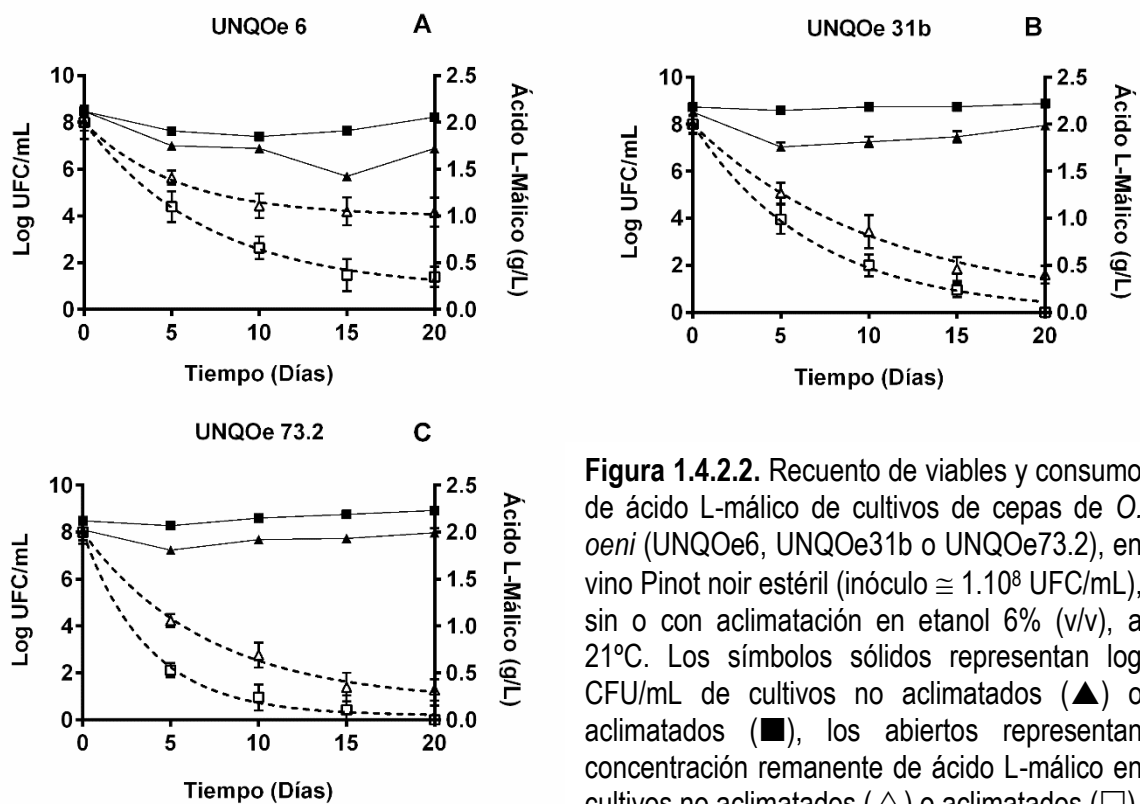


Figura 1.4.2.2. Recuento de viables y consumo de ácido L-málico de cultivos de cepas de *O. oeni* (UNQOe6, UNQOe31b o UNQOe73.2), en vino Pinot noir estéril (inóculo $\cong 1.10^8$ UFC/mL), sin o con aclimatación en etanol 6% (v/v), a 21°C. Los símbolos sólidos representan log CFU/mL de cultivos no aclimatados (▲) o aclimatados (■), los abiertos representan concentración remanente de ácido L-málico en cultivos no aclimatados (△) o aclimatados (□). La línea discontinua muestra el ajuste de acuerdo con la Ecuación 1.

Tabla 1.4.2. Número de células viables de cepas de *O. oeni*, antes y después de 20 días de incubación en vino Pinot noir estéril y parámetros cinéticos de consumo de ácido L-málico (Ecuación 1), obtenidos de la Figura 1.4.2.2

	UNQOe 6		UNQOe 31b		UNQOe 73.2	
	Sin aclim	Aclim	Sin aclim	Aclim	Sin aclim	Aclim
N_0 (UFC/mL)	3.16E+08	3.16E+08	3.16E+08	5.01E+08	1.27E+08	3.07+E08
Log N/N_0	-1.59	-0.24	-0.57	0.16	-0.12	0.44
CAM (%)	48.00 ± 4.38 ^c	82.50 ± 3.50 ^b	78.50 ± 3.75 ^b	99.98 ± 2.27 ^a	84.00 ± 5.61 ^b	99.99 ± 7.7 ^a
K	0.19 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.27 ± 0.02
R ²	0.9963	0.9977	0.9948	0.9946	0.9959	0.9969
[MA _i]	0.99	0.21	0.08	0.00	0.19	0.05

N_0 : Número inicial de viables (tiempo 0)

Log N/N_0 : Cambio en el número de viables a 20 días de incubación.

CAM (%): Porcentaje de ácido L-málico consumido al día 20.

K: Constante de decaimiento exponencial de primer orden.

R²: Coeficiente de determinación.

[MA_i]: Concentración mínima de ácido L-málico (tiempo infinito).

Las diferentes letras (a, b y c) indican s estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

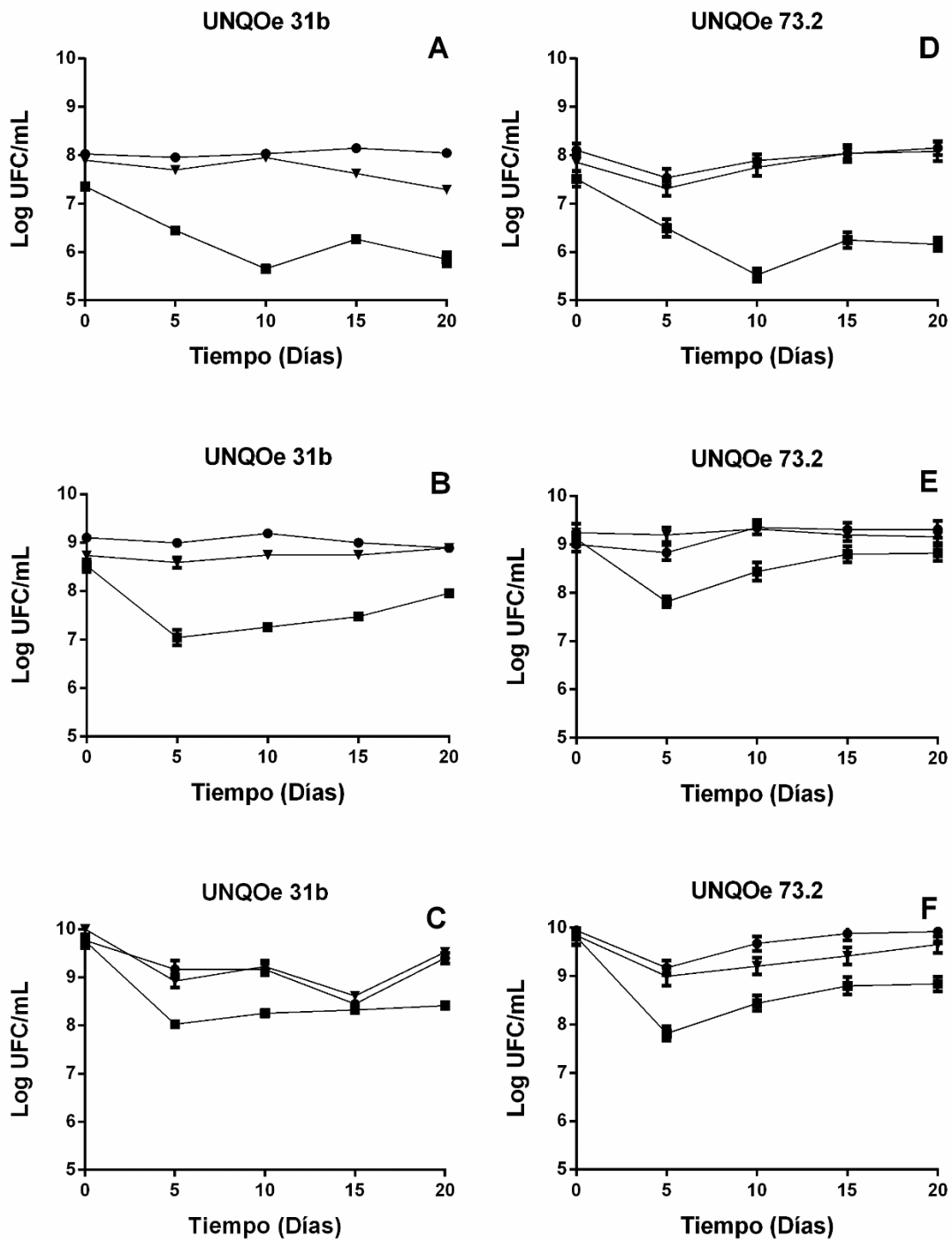


Figura 1.4.2.3. Viabilidad después de la incubación en vino Pinot noir estéril de cultivos de las cepas UNQOe31b y UNQOe73.2 de *O. oeni*, con diferentes inóculos; (A y D) 1.10^8 UFC/mL, (B y E) 1.10^9 UFC/mL y (C y F) 1.10^{10} UFC/mL. Los cultivos se aclimataron en etanol 6% v/v, a 21 °C (▼), etanol 10% v/v, a 21 °C (●), o no se aclimataron (■).

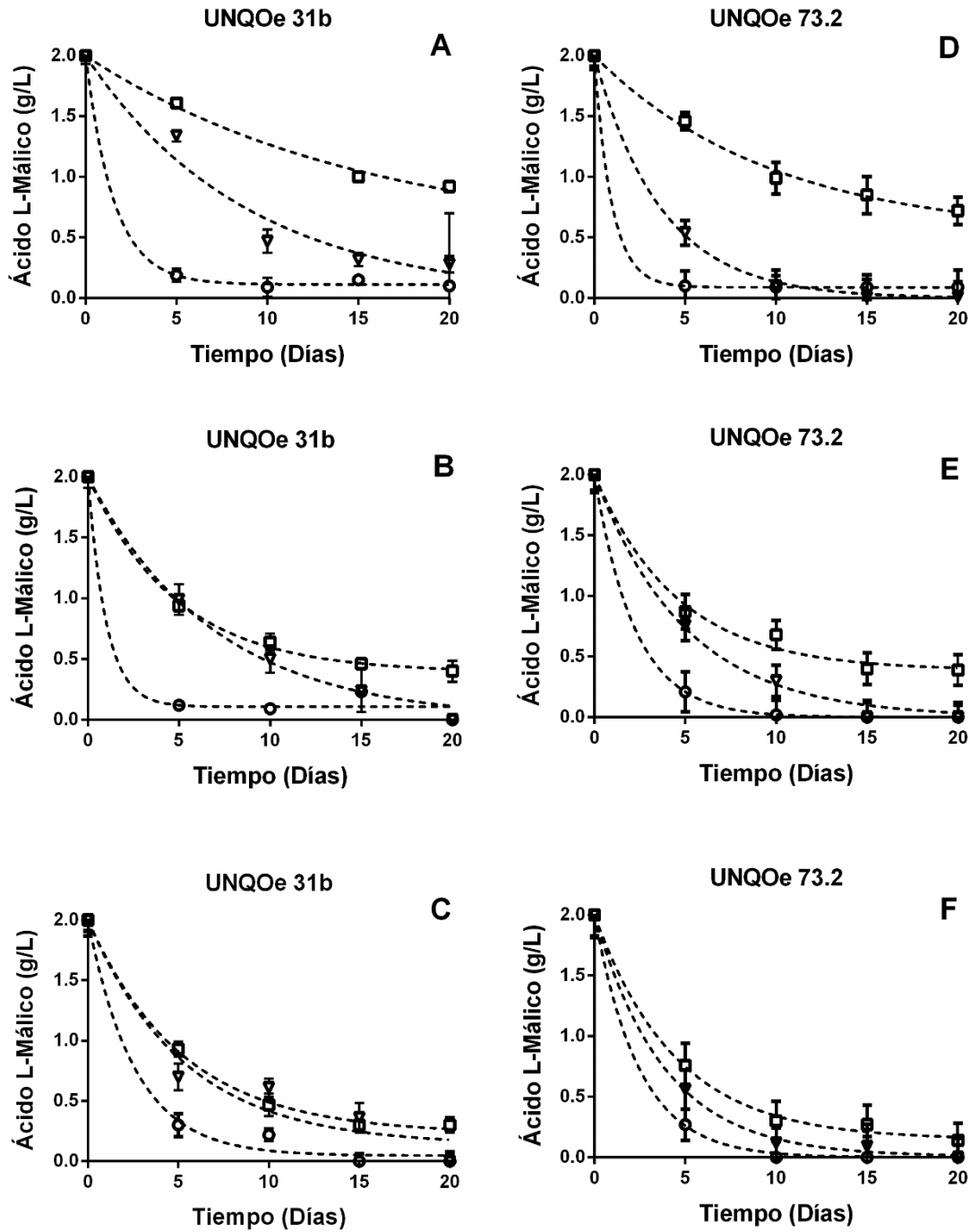


Figura 1.4.2.4. Concentración remanente de ácido L-málico por incubación de cultivos de las cepas UNQOe31b y UNQOe73.2 de *O. oeni* en vino Pinot noir estéril, con diferentes inóculos: (A y D) 1.10^8 UFC/mL, (B y E) 1.10^9 UFC/mL y (C y F) 1.10^{10} UFC/mL. Los cultivos se aclimataron en etanol 6% (v/v) a 21 °C (∇), etanol 10% (v/v) a 21 °C (\circ), o no se aclimataron (\square). La línea discontinua representa el ajuste de acuerdo con el decaimiento exponencial de una fase según la Ecuación 1.

1.5. DISCUSIÓN

Como se mencionó, la tendencia actual en enología está enfocada en el empleo de iniciadores elaborados con cepas bacterianas autóctonas, mejor adaptadas a las condiciones específicas de un área productora de vinos y capaces de mantener el *terroir* regional. El diseño de iniciadores malolácticos nativos, comienza con la definición de las propiedades del vino a elaborar y el aislamiento, identificación y selección de cepas bacterianas obtenidas de FML espontáneas y exitosas de vinos de la región (Ruiz et al. 2010b). La selección de cepas nativas de BAL debe hacerse según criterios que se relacionan con sus propiedades tecnológicas y enológicas. El buen comportamiento de los microorganismos bajo condiciones de estrés requiere mantener las principales funciones de su membrana plasmática, para controlar la permeabilidad iónica y regular el intercambio de solutos entre células y ambiente externo (Weber & De Bont 1996; Šajbidor 1997). Las propiedades de barrera de la membrana revisten especial importancia en la transducción de energía celular y dependen críticamente del estado físico de las bicapas lipídicas (Mansilla et al. 2004), que resulta susceptible a cambios de temperatura y a otros factores. El efecto del etanol sobre las células está bien documentado (Barry & Gawrisch 1994; Graça da Silveira et al. 2002) y se sabe que afecta el estado físico y las funciones biológicas de la membrana plasmática. Interactúa a nivel de la interfaz lípido-agua, debilitando la barrera hidrofóbica para el libre intercambio de moléculas polares, perturbando así su estructura y función (Barry & Gawrisch 1994; Weber & De Bont 1996).

El trabajo presentado en este Capítulo tuvo como objetivo analizar los efectos sobre la viabilidad celular y el consumo de ácido L-málico en vino estéril, de diferentes tratamientos de aclimatación y de concentración bacteriana inoculada de cepas nativas patagónicas de *Lb. plantarum* (UNQLp11, UNQLp22, UNQLp155, UNQLp133 y UNQLp65.3) y de *O. oeni* (UNQOe73.2, UNQOe31b, y UNQOe6),

Los ensayos de fermentación mostraron que la aclimatación previa de los cultivos en concentraciones sub-letales de etanol (6% y 10% v/v) mejoraba la supervivencia bacteriana en el vino estéril y el consumo de ácido L-málico de las

cepas de *O. oeni*, si el inóculo empleado era superior a 1×10^8 UFC/mL. Los valores graficados en la Figura 1.4.2.4 mostraron un buen consumo de ácido L-málico en todas las condiciones de aclimatación probadas, pero la cinética de consumo de este ácido se vio afectada por la concentración de etanol durante la aclimatación, siendo más rápida a mayor contenido de etanol.

El proceso de aclimatación puede compararse con la adaptación natural que sufren las bacterias durante el proceso de vinificación. La pre-exposición de las células a condiciones de estrés sub-letal afecta positivamente la supervivencia celular en el vino, mejorando el rendimiento del cultivo inoculado. Chu-Ky et al. (2005) hallaron una mejor supervivencia de cepas de *O. oeni* cuando los cultivos se sometían previamente a tratamientos combinados de baja temperatura, acidez y etanol. Sus resultados demostraron que shocks de frío (14 y 8 °C) rigidizaban la membrana plasmática sin afectar la supervivencia celular; en cambio, shocks de etanol (10 a 14% v/v) inducían una instantánea fluidización de la membrana seguida por una rigidización, que resultaba en baja viabilidad. Por su parte, los shocks ácidos (pH 3.0 y 4.0) ejercían un efecto rigidizante sin afectar la viabilidad. La combinación de frío y etanol (14 °C y etanol 14% v/v) resultaron en una fuerte rigidización de la membrana, y las células de *O. oeni* sobrevivieron mejor en esta condición que a un shock simple de etanol. Pero la combinación de acidez y etanol (10% v/v, pH 3.5) rigidizó la membrana y condujo a la muerte celular total. En cambio, la viabilidad se recuperó si las bacterias se sometían primero a frío (8 °C) y luego a etanol y acidez.

Costantini et al. 2015, aplicando un enfoque combinado de transcriptómica y proteómica, analizaron la respuesta fisiológica de un *starter* comercial de *O. oeni* a un proceso de aclimatación previo a su inoculación en vino. Los resultados demostraron que la composición del medio de aclimatación afectaba notablemente la respuesta del *starter*. Así, concentraciones sub-letales de etanol incrementaban significativamente la expresión de genes relacionados con la FML y con la respuesta a estrés, principalmente vinculada al control de la envoltura celular (membrana plasmática, pared celular y producción de exopolisacárido o EPS). Hallaron que concentraciones de etanol 8% y 12% v/v modulaban de manera

diferencial la respuesta a estrés; el menor nivel inducía la formación de EPS, mientras que el mayor provocaba cambios estructurales en la composición de la membrana. En ambas condiciones se activaban diferentes rutas de respuesta a estrés. Bon et al. (2009) investigaron ocho genes involucrados en la adaptación de *O. oeni* al medio vino, y señalaron que resultaban inducidos o reprimidos durante shocks con etanol y pH bajo.

El genoma de *O. oeni* es compacto, de 1.8 Mb, resultado de un elevado grado de racionalización genómica ocurrido durante su adaptación al complejo entorno del vino. El análisis reciente de varios genomas de *O. oeni* mostró la presencia de una región central o *core* compartida y hasta un 10% de variación en la capacidad codificante entre cepas. Es probable que esta variación sea la responsable de las diferentes fenotipos observados durante la vinificación (Bartowsky & Borneman 2011).

da Silveira et al. (2003), por su parte, hallaron que células de *O. oeni* crecidas en presencia de etanol incrementaban el orden en la interfaz lípido-agua de su membrana, disminuyendo su permeabilidad en respuesta al efecto fluidificante del etanol. Estas células adaptadas al etanol pudieron retener compuestos intracelulares de manera más eficiente (da Silveira & Abee 2009), explicando la mejora en el consumo de ácido L-málico, en comparación con las células no aclimatadas.

La mayoría de los cultivos malolácticos comerciales disponibles están elaborados con cepas de *O. oeni*, por considerarse la especie mejor adaptada al vino. Sin embargo, algunas especies de *Lactobacillus* poseen muchas características favorables que las hacen candidatas adecuadas para su uso como iniciadores malolácticos. Bravo-Ferrada et al. (2014) estudiaron el efecto del contenido de etanol durante la aclimatación de cepas enológicas patagónicas de *Lb. plantarum* y hallaron que la inoculación directa de las mismas en vino sintético (etanol 14% v/v, pH 3.5) inducía una pérdida de la integridad de membrana, con la consecuente disminución de la viabilidad celular, en más de seis órdenes de magnitud a las 24 h de incubación. Sin embargo, cuando las bacterias se aclimataron previamente en etanol 6% ó 10% v/v, el daño en la membrana resultó

menor y la viabilidad en vino sintético mejoró, así como el consumo de ácido L-málico al final del ensayo. En un trabajo posterior (Bravo-Ferrada et al. 2015a), demostraron cambios en la composición lipídica de la membrana, con disminución de la relación de ácidos grasos insaturados/saturados (U/S) después de la aclimatación, que resultó más drástica a mayor concentración de etanol. La reducción en la relación U/S fue simultánea con la disminución en las longitudes de cadena de los ácidos grasos. Además, el incremento en el consumo de ácido L-málico se correlacionó con la disminución en la relación U/S y la disminución en la longitud de cadena de los ácidos grasos. Sin embargo, el porcentaje de consumo de ácido L-málico resultó específico para cada cepa (Bravo-Ferrada et al. 2015a).

Los resultados expuestos en este Capítulo muestran que, en las cepas UNQLp11 y UNQLp22 de *Lb. plantarum*, el tratamiento previo de aclimatación no resultó relevante para su viabilidad y CAM en vino Pinot noir estéril. Además, los ensayos de fermentación resultaron satisfactorios con menores tamaños de inóculo que los empleados con las cepas de *O. oeni*. La especie *Lb. plantarum* posee mayor velocidad de crecimiento que *O. oeni* en los medios de cultivo (48 h vs. 7 días), y diferentes cepas muestran muy buena viabilidad en vino, hecho que las convierte en una alternativa para formular cultivos malolácticos, con posible aplicación en vinos tintos patagónicos. Sin embargo, de las cinco cepas de *Lb. plantarum* ensayadas, UNQLp133, UNQLp155 y UNQLp65.3 no resultaron tan eficientes como UNQLp11 y UNQLp22 cuando se empleó un inóculo de $\sim 5,10^7$ UFC/mL, siendo sólo UNQLp155 aclimatada la que logró consumir un mayor porcentaje de ácido L-málico ($\sim 50\%$), valor inferior al alcanzado por las cepas UNQLp11 y UNQLp22. Esta diferencia podría atribuirse a que estas últimas se aislaron de un vino cuyas FA y FML transcurrieron, ambas, de modo espontáneo (Brizuela et al. 2017).

Resulta también importante enfatizar que los requerimientos nutricionales de *Lb. plantarum* son menores que los de *O. oeni*, además de poseer una mayor velocidad de crecimiento. Asimismo, algunas cepas patagónicas de *Lb. plantarum* mostraron capacidad de conducir fermentaciones con inóculos menores a los

requeridos para las cepas de *O. oeni* y sin la necesidad de una aclimatación previa, hecho que resulta tecnológicamente relevante para la producción de biomasa a bajo costo.

1.6. CONCLUSIONES

Los ensayos expuestos en este Capítulo permitieron evaluar la capacidad de adaptación a un vino estéril y de conducir su fermentación de ocho cepas patagónicas de *BAL*, cinco de *Lb. plantarum* (UNQLp11, UNQLp22, UNQLp65.3, UNQLp133 y UNQLp155) y tres de *O. oeni* (UNQOe6, UNQOe31b y UNQOe73.2). Si bien *O. oeni* se considera como la especie con mejor capacidad de adaptación a las condiciones hostiles del vino, los resultados hallados revelan que algunas cepas de *Lb. plantarum* resultan aptas para conducir fermentaciones en vino estéril, con mayor capacidad de consumir ácido L-málico, empleando inóculos menores y sin requerir aclimatación previa. Otras ventajas potenciales son, de acuerdo a distintos autores, la presencia de mayor número de genes relacionados con características organolépticas del vino (Matthews et al. 2006; du Toit et al. 2011).

En relación a las cepas patagónicas de *Lb. plantarum*, resulta necesario avanzar en estudios de preservación de cultivos, de inoculación de cultivos preservados en vino, así como analizar la capacidad de modificar el perfil de compuestos aromáticos del vino por parte de estas cepas, para contar con suficientes elementos de juicio que permitan decidir cuáles resultan las más adecuadas para formular un cultivo iniciador nativo.

Capítulo 2

Optimización de las
condiciones de
aclimatación,
preservación e
inoculación de
cultivos de cepas de
O. oeni y *Lb.*
plantarum

2.1. INTRODUCCIÓN

Para la industria vitivinícola resulta fundamental lograr la normalización de las biotas microbianas involucradas en la FA y en la FML mediante inoculación de cultivos iniciadores, elaborados con cepas seleccionadas de levaduras y BAL. Esto permite obtener vinos de calidad controlada, corrigiendo la variabilidad observada entre vendimias en fermentaciones naturales y disminuyendo el riesgo de sucesos negativos asociados, como detenciones prematuras, retrasos y contaminación de los mostos, entre otros. Aún cuando existe una amplia oferta de iniciadores comerciales, la necesidad de satisfacer los reclamos del mercado globalizado del vino, guiado por la demanda y con sobreoferta, obligó a ampliar las fronteras de búsqueda y seleccionar nuevas cepas, capaces de otorgarle a los vinos calidad diferencial. Por esto, el empleo de cultivos iniciadores elaborados con cepas de levaduras y de BAL indígenas de cada área productiva, es una práctica en expansión en la vitivinicultura mundial.

En el caso de la FML, los cultivos concentrados de BAL deben preservarse para luego comercializarse en forma líquida, congelada o deshidratada, resultando de mayor interés para los bodegueros los iniciadores de inoculación directa. Por lo tanto, el método de preservación de estas bacterias adquiere suma relevancia, y deberá garantizar una buena supervivencia celular y una adecuada funcionalidad. Los más empleados son la liofilización y la congelación, que reducen la actividad de agua celular, inhibiendo las reacciones químicas y biológicas responsables de degradaciones (Lodato et al. 1999).

En los procesos de congelación se emplean temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, obteniendo mayor supervivencia bacteriana cuando la temperatura es menor (Fonseca et al. 2001). Diferentes especies y cepas de BAL poseen distinta sensibilidad a la congelación y a la subsecuente descongelación. En cultivos descongelados es posible observar células dañadas, no dañadas y muertas y la capacidad de recuperación celular es cepa dependiente (Fonseca et al. 2019). El daño celular se relaciona de modo directo con la velocidad de congelación. Cuando el enfriamiento se realiza lentamente, la cristalización de agua comienza en el medio externo, mientras el interior celular se mantiene en estado sobre-

enfriado, produciéndose la salida de agua para compensar la diferencia de presión osmótica y una deshidratación progresiva de las células. Si el enfriamiento es rápido, puede ocurrir cristalización del agua intracelular, dañando la membrana plasmática y ocasionando pérdida de material intracelular. La velocidad de congelación ideal resulta aquella a la cual se promueve un rápido crecimiento de hielo extracelular, generando un gradiente osmótico entre interior y exterior celular. Sin embargo, las bajas temperaturas y el incremento de viscosidad del medio pueden producir un sobre enfriamiento del interior celular, impidiendo la difusión de agua intracelular (Wolfe & Bryant 1999; Santivarangkna et al. 2008).

En la liofilización el agua se remueve de la muestra congelada por sublimación del hielo, pasando así del estado sólido al gaseoso (Perry 1998; Casp & Abril 1999). El material celular se obtiene como un concentrado en estado liofilizado. La salida de agua expone a las bacterias a un medio donde la actividad de agua de la fase gaseosa es inferior a la del interior celular. Esta exposición produce contracción del citoplasma, precipitación de sales y oxidación de compuestos. Las propiedades intrínsecas de las bacterias y su estado fisiológico al momento de la liofilización pueden influir en el tipo de macromoléculas involucradas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana). Éstas son los principales sitios blanco de daño (Castro et al. 1997), siendo su alteración responsable de la pérdida de viabilidad celular. La liofilización presenta numerosas ventajas: baja temperatura de trabajo (el producto se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) que evita alterar estructuras termolábiles; ausencia de oxígeno que evita oxidación; ausencia de agua libre que evita hidrólisis y crecimiento microbiano; baja humedad residual que asegura mayor estabilidad de los productos en el tiempo. Asimismo, los cultivos liofilizados no requieren cadena de frío para su almacenamiento y distribución, y poseen menor volumen que los congelados, resultando ventajoso en términos de almacenamiento y transporte (Franks 1998; Coulibaly et al. 2011).

Para evitar daños celulares durante los procesos de preservación se requiere adicionar sustancias protectoras, resultando críticos la elección correcta de la misma y el empleo en una concentración adecuada. Azúcares y aminoácidos se han empleado en la preservación de proteínas, enzimas, liposomas o productos

farmacéuticos (Zayed & Roos 2004, Ananta et al. 2005, Santivarangkna et al. 2007, Schwab et al. 2007). Se reconoce la capacidad protectora de trehalosa y sacarosa para la preservación de cultivos de numerosas especies del género *Lactobacillus* (Santivarangkna et al. 2008), y también se demostró que trehalosa y glutamato resultan buenos crioprotectores para cultivos de cepas de *O. oeni* (Zhao & Zhang 2009; Zhang et al. 2012). Estos compuestos contienen en su molécula grupos hidroxilo (-OH) y/o amino (-NH₂), que pueden reemplazar el agua que rodea los residuos polares de fosfolípidos y proteínas, formando puentes de hidrógeno y manteniendo su estructura en ausencia de agua (Zayed & Roos 2004, Schwab et al. 2007).

Una correcta elección del agente protector, que asegure una preservación exitosa, de cultivos bacterianos deberá considerar diferentes parámetros:

- los cultivos en fase estacionaria temprana sobreviven mejor a la liofilización que aquéllos en fase exponencial media (Carvalho et al. 2004; Velly et al. 2014).
- el crecimiento celular a pH bajo (ej. 3.5) otorga a los cultivos mayor tolerancia a la deshidratación (Li et al. 2009b).
- el contenido de ácidos grasos cíclicos en membrana (ej. ácido lactobacílico) se ha relacionado con la supervivencia a la liofilización en *Lb. bulgaricus* (Li et al. 2009a; Velly et al. 2014) y con mayor tolerancia a las condiciones estresantes del vino en *O. oeni* (Chu-Ky et al. 2005). El mismo dependerá de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento.
- tanto la pared celular como las macromoléculas de superficie resultan fundamentales para la supervivencia celular y la interacción con su medio ambiente. Las propiedades superficiales de la envoltura celular, incluyendo la membrana lipídica, dependen de las condiciones de cultivo (Murga et al. 2000; Santivarangkna et al. 2008).
- las distintas especies y cepas (variabilidad inter-específica) pueden exhibir diferente comportamiento durante la liofilización y el subsecuente almacenamiento, aún en condiciones comparables (Carvalho et al. 2002, 2003a, b; Yao et al. 2009).

- la preservación por largos periodos de tiempo se favorece por un almacenamiento a bajas temperaturas, con protección de luz y humedad (Abadias et al. 2001, Zhao & Zhang 2009).

Un tema escasamente abordado es el relativo al efecto de la aclimatación previa de los cultivos bacterianos sobre la preservación de cepas de interés enológico. Como se describió en el Capítulo 1, la aclimatación produce cambios drásticos en la composición lipídica de la membrana plasmática de cepas de *O. oeni* (Silveira et al. 2004) y de *Lb. plantarum* (Bravo-Ferrada et al. 2015a). En este último caso, la aclimatación en etanol 6 ó 10% v/v produjo un incremento significativo de los ácidos grasos saturados, así como una disminución de su longitud, como mecanismo de tolerancia al incremento de fluidez provocado por el etanol. Además, cultivos de la cepa patagónica UNQLp155 de *Lb. plantarum*, liofilizados en presencia de trehalosa, mostraron diferentes niveles de supervivencia cuando se inocularon en vino sintético, en función de la aclimatación previa. La aclimatación en etanol 6% v/v resultó más favorable que en 10% v/v, condición en la cual, mediante AFM, se observaron daños en la membrana plasmática (Bravo-Ferrada et al. 2015b). Tanto en cultivos aclimatados como en no aclimatados ocurría una alteración severa de la permeabilidad celular, afectando la funcionalidad bacteriana en vino sintético e indicando que la recuperación de la integridad de membrana constituye una etapa necesaria para lograr un buen consumo del ácido L-málico.

2.2. OBJETIVO

El objetivo de estudio del presente Capítulo consistió en analizar la eficacia de compuestos crioprotectores (trehalosa, sacarosa y glutamato) en la preservación (congelación a -20 °C y -80 °C y liofilización) de cultivos de cinco cepas de *Lb. plantarum* y dos de *O. oeni*, así como el efecto de la aclimatación previa de los mismos sobre la recuperación celular posterior. Se examinó la viabilidad celular después de la preservación y durante la incubación de las bacterias en vino sintético. En los cultivos liofilizados de las dos cepas de cada especie que

exhibieron mejor comportamiento, se evaluó el medio de re-hidratación, previo a su inoculación en un vino Pinot noir estéril, evaluando la supervivencia y el consumo de ácido L-málico.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Cepas, medios y condiciones de crecimiento

Se utilizaron las cepas UNQLp133, UNQLp65.3, UNQLp155, UNQLp11 y UNQLp22 de *Lb. plantarum* y UNQOe 73.2 y UNQOe 31b de *O. oeni*. Las cepas de *Lb. plantarum* se cultivaron en 10 mL de caldo MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) (De Man et al. 1960), a 28 °C, pH 6,5, durante 48 h. Las cepas de *O. oeni* se cultivaron en 10 mL de caldo MLO, a 28 °C, pH 4,8, durante 7 días.

2.3.2. Condiciones de aclimatación de cultivos

Cultivos en fase estacionaria temprana ($\sim 5 \times 10^9$ UFC/ml) se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min y las células se resuspendieron en igual volumen de medio de aclimatación con etanol 6% v/v (MRS 50 g/L, D (-) fructosa 40 g/L, D (-) glucosa 20 g/L, ácido L-málico 4 g/L, Tween 80 1 g/L, piridoxina 0,1 mg/L. pH 4.6). Los cultivos se incubaron a 21 °C, durante 48 h, en el medio de aclimatación.

2.3.3. Condiciones de liofilización y congelación

Los cultivos bacterianos, aclimatados o no, se centrifugaron (13000 x g, 6 min) a temperatura ambiente, en condiciones asépticas. Los sedimentos se lavaron una vez con solución tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5), se centrifugaron y resuspendieron en 1 mL de glutamato sódico 2,5% p/v (pH 6,0) (Carvalho et al. 2003b), de sacarosa 20% p/p ó de trehalosa 20% p/p (Tymczynszyn et al. 2007; Carvalho et al. 2008), de modo de obtener una concentración celular de $\sim 1 \times 10^{10}$ UFC/mL. Las cepas UNQOe73.2 y UNQOe31b se resuspendieron sólo en trehalosa 20% p/p, ya que estudios preliminares no mostraron buena recuperación celular cuando se emplearon glutamato o sacarosa como crioprotectores.

Para la preservación por liofilización las suspensiones celulares se congelaron durante 48 h a -80 °C y se deshidrataron en un liofilizador (Labconco/ Freezone

4.4, Kansas City, MO, USA), durante 24 h, en condiciones de condensador a -50 °C y presión de cámara inferior a 0,05 mbar. Las muestras se almacenaron a 4 °C, por 48 h, protegidas de luz y humedad. Los cultivos para ensayos en vino Pinot noir estéril se almacenaron en iguales condiciones durante 2 meses.

Para la preservación por congelación, las suspensiones celulares se lavaron una vez con solución tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5), se centrifugaron, se concentraron a $\sim 1 \times 10^{10}$ UFC/mL y se congelaron a -20 o -80 °C durante 30 días, empleando glutamato, sacarosa ó trehalosa como crioprotectores, en iguales condiciones a las empleadas en la liofilización. Las muestras se descongelaron a 28 °C durante 15 min.

2.3.4. Tolerancia bacteriana a la incubación en vino sintético luego de la preservación

Los cultivos liofilizados y congelados, aclimatados o no, se inocularon en vino sintético y se incubaron a 21 °C por 24 h. La composición del vino sintético fue la siguiente:

Medio	Composición	Fuente
Vino sintético	Ácido tartárico 50 g/L, ácido L-málico 4,5 g/L, ácido acético 0,6 g/L, D(-) fructosa 2 g/L, D(-) glucosa 2 g/L, extracto de levadura 1 mg/L, cloruro de sodio 0,2 mg/L, sulfato de amonio 1 mg/L, fosfato de potasio 2 mg/L, sulfato de magnesio heptahidrato 0,2 mg/L, manganeso sulfato 0,05 mg/L, etanol 13 o 14 % v/v , pH = 3.5	(Bravo-Ferrada et al. 2014)

2.3.5. Recuento de bacterias viables

El número de células viables de *Lb. plantarum* y *O. oeni* se determinó por recuento en placa de MRS o MLO (Biokar Diagnostics), antes y después de los tratamientos de preservación y luego de la incubación en vino sintético. Las placas se incubaron 24 h, a 28 °C. La supervivencia celular se expresó como log N/N₀,

donde N es la concentración en UFC/mL después de un tratamiento dado y N_0 previo al tratamiento.

2.3.6. Re-hidratación celular y efecto sobre la incubación en vino tinto estéril

Las cepas liofilizadas, aclimatadas o no, se rehidrataron en 1 ml de solución fisiológica 0,9% p/v ó en el medio de cultivo correspondiente (caldo MRS o MLO) durante 24 h, a temperatura ambiente. Los cultivos se inocularon en 10 mL de vino Pinot noir estéril, que se incubó 21 días a 21 °C. Los cultivos se inocularon con y sin el medio de rehidratación (el medio se removió por centrifugación de 10 min a 13000 x g, 4 °C), con el propósito de simular las condiciones de cultivos comerciales, que incluyen un activador (nutrientes, vitaminas y sales) que refuerza la supervivencia bacteriana. La cinética de crecimiento se analizó mediante recuento de bacterias viables por cultivo en placas de MRS o MLO. La disminución en la concentración del ácido L-málico del vino se determinó mediante un kit enzimático (el mismo descrito en el capítulo 1, sección 1.3.5).

2.3.7. Análisis estadístico

Se utilizaron tres cultivos independientes de cada cepa bacteriana y las determinaciones se realizaron por duplicado. Para el análisis de la varianza (ANOVA) se aplicó el programa estadístico STATISTIX 8 *Software (Analytical Software, Tallahassee, FL-USA)*. Se realizaron comparaciones múltiples de Dunnett a dos caras, con un control, y si P resultaba <0,05 la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

2.4. RESULTADOS

El tratamiento de cultivos bacterianos con crioprotectores, previo a su preservación, ha mostrado ser efectivo para la posterior recuperación celular. En trabajos previos del LMM se observó que la viabilidad bacteriana de cultivos de cepas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni*, luego de su congelación o liofilización sin crioprotectores, disminuía en más de 4 log (Bravo-Ferrada et al. 2015a). En cambio, si la preservación se realizaba en presencia de agentes protectores como

trehalosa, glutamato o sacarosa, la viabilidad de los cultivos congelados o liofilizados no mostraba diferencias significativas con las de cultivos frescos.

2.4.1. efecto de diferentes criopreservantes, condiciones de aclimatación y métodos de preservación en cultivos de cepas de *Lb. plantarum*

Con el propósito de conocer el efecto de la aclimatación y la preservación sobre las propiedades tecnológicas de estas bacterias, cultivos congelados ó liofilizados se inocularon en vino sintético con etanol 13 ó 14% v/v. El vino se incubó a 21 °C y a las 24 h se evaluaron la supervivencia celular y el consumo de ácido L-málico. Las Figuras 2.4.1.1, 2.4.1.2, 2.4.1.3, 2.4.1.4 y 2.4.1.5 muestran la evolución de la viabilidad de cultivos de cepas de *Lb. plantarum*, sometidas a preservación, luego de su incubación por 24 h en vino sintético, comparadas con la de cultivos frescos. La mayor supervivencia se observó en los cultivos congelados a -80 °C y la menor en los liofilizados, si bien las cepas UNQLp11 y UNQLp22 mostraron menor viabilidad en los cultivos congelados a -20 °C.

En todas las cepas ensayadas la aclimatación en etanol 6% v/v, previa a la preservación de los cultivos, condujo a un incremento de la supervivencia bacteriana en vino sintético, respecto de los cultivos no aclimatados. En la mayoría de los cultivos congelados a -80 °C no se observaron diferencias significativas con los cultivos frescos. En el caso particular de UNQLp11, se comprobó que los cultivos sin aclimatar y los congelados a -80 °C no mostraban diferencias significativas respecto de los cultivos frescos. En general, la cepa UNQLp65.3 resultó la más sensible a la preservación por congelación ó liofilización, si bien sus cultivos aclimatados, congelados a -80 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v, no mostraron diferencias significativas respecto de cultivos frescos. Se observó también que el incremento en el contenido de etanol del vino, de 13 a 14% v/v, daba lugar a una drástica disminución de la viabilidad celular en cultivos de las cepas UNQLp65.3, UNQLp133 y UNQLp155, para los tres procesos de preservación.

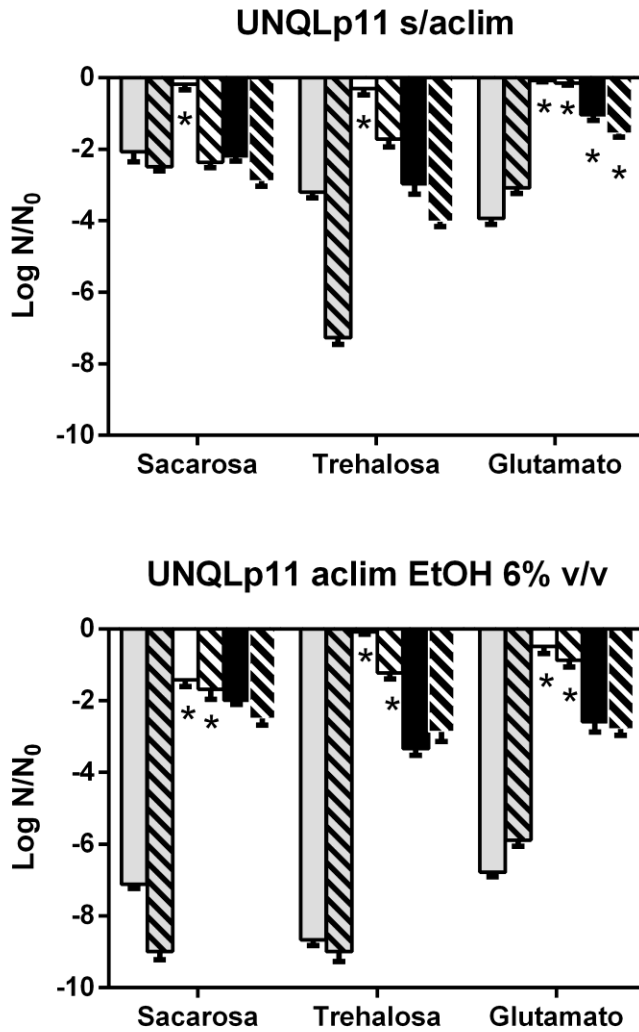


Figura 2.4.1.1. Recuento de bacterias viables en cultivos de la cepa UNQLp11 de *Lb. plantarum* (sin aclimatar y aclimatados), luego de distintos procesos de preservación e incubación en vino sintético 24 h: congelación a -80 °C, a -20 °C ó liofilización, en presencia de sacarosa 20% p/v, trehalosa 20% p/v ó glutamato 2,5% p/v.

Para cada crioprotector: las barras grises indican cultivos congelados a -20 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras blancas indican cultivos congelados a -80 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras negras indican cultivos liofilizados e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas). El símbolo (*) indica que no existen diferencias significativas respecto a cultivos frescos ($P < 0.05$).

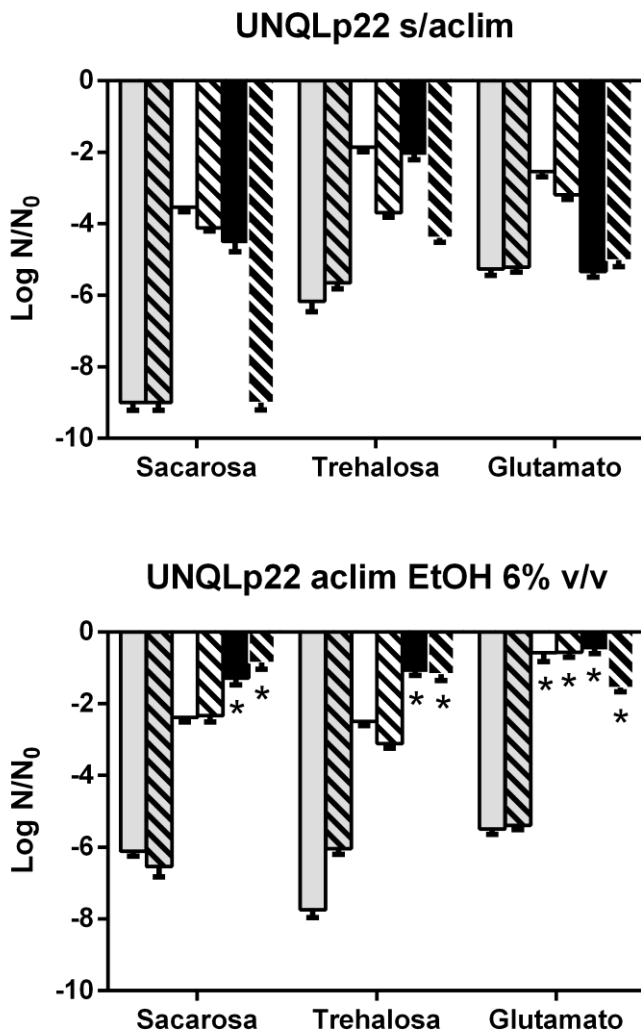


Figura 2.4.1.2. Recuento de bacterias viables en cultivos de la cepa UNQLp22 de *Lb. plantarum* (sin aclimatar y aclimatados), luego de distintos procesos de preservación e incubación en vino sintético por 24 h: congelación a -80 °C, a -20 °C ó liofilización en presencia de sacarosa 20% p/v, trehalosa 20% p/v ó glutamato 2,5% p/v. Para cada crioprotector: las barras grises indican cultivos congelados a -20 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras blancas indican cultivos congelados a -80 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras negras indican cultivos liofilizados e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas). El símbolo (*) indica que no existen diferencias significativas respecto a cultivos frescos (P <0.05).

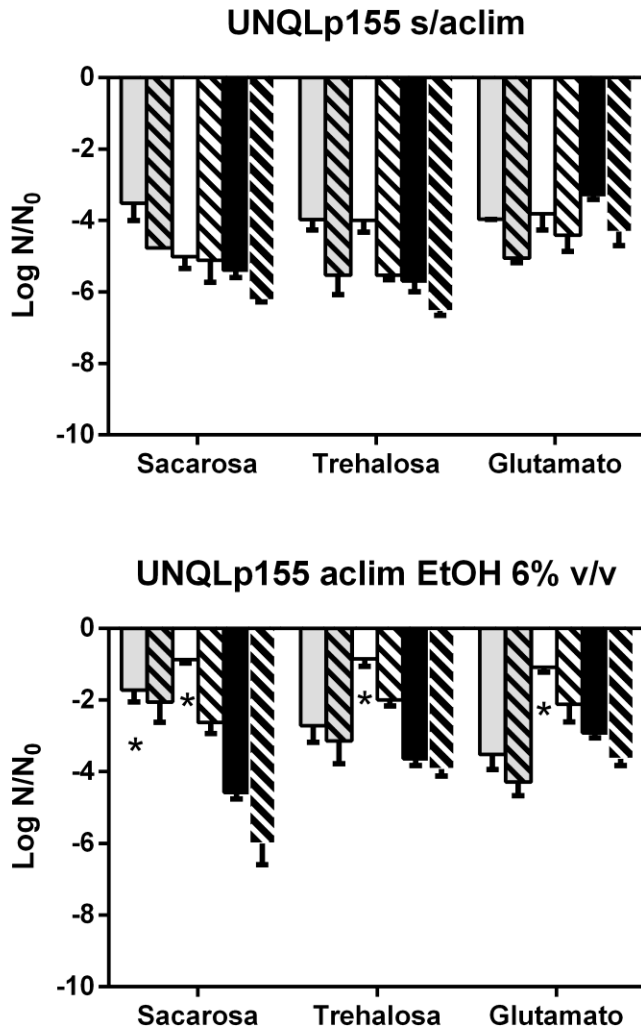


Figura 2.4.1.3. Recuento de bacterias viables en cultivos de la cepa UNQLp155 de *Lb. plantarum* (sin aclimatar y aclimatados), luego de distintos procesos de preservación e incubación en vino sintético por 24 h: congelación a -80 °C, a -20 °C ó liofilización, en presencia de sacarosa 20% p/v, trehalosa 20% p/v ó glutamato 2,5% p/v. Para cada crioprotector: las barras grises indican cultivos congelados a -20 °C e incubadas en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras blancas indican cultivos congelados a -80 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras negras indican cultivos liofilizados e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas). El símbolo (*) indica que no existen diferencias significativas respecto a cultivos frescos (P <0.05).

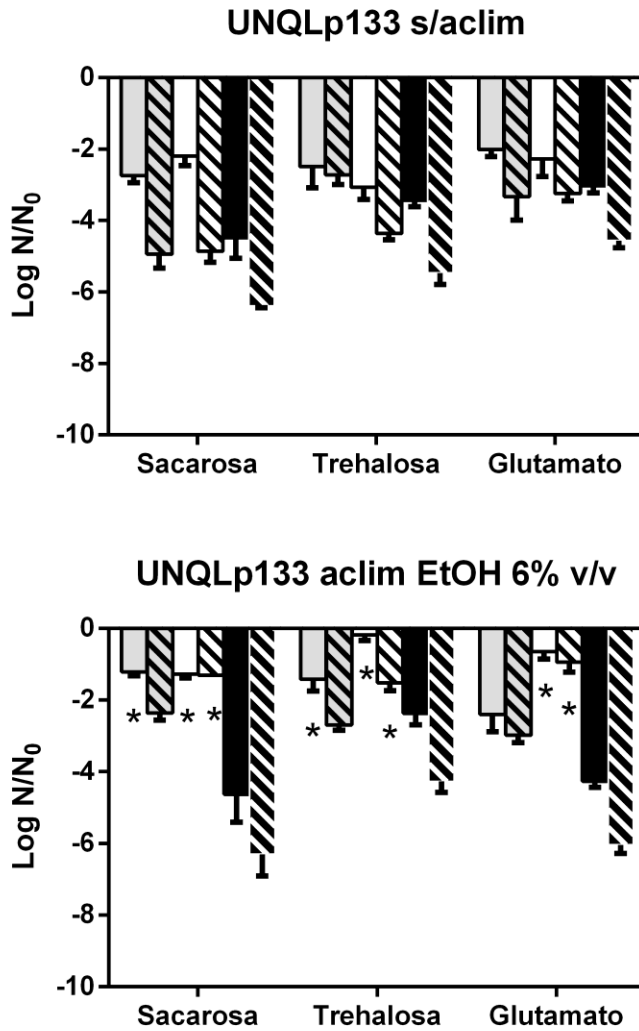


Fig. 2.4.1.4. Recuento de bacterias viables de cultivos de la cepa UNQLp133 de *Lb. plantarum* (sin aclimatar y aclimatados), luego de distintos procesos de preservación e incubación en vino sintético por 24 h: congelación a -80 °C, a -20 °C ó liofilización, en presencia de sacarosa 20% p/v, trehalosa 20% p/v ó glutamato 2,5% p/v. Para cada crioprotector: las barras grises indican cultivos congelados a -20 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras blancas indican cultivos congelados a -80 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras negras indican cultivos liofilizados e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas). El símbolo (*) indica que no existen diferencias significativas respecto a cultivos frescos (P <0.05).

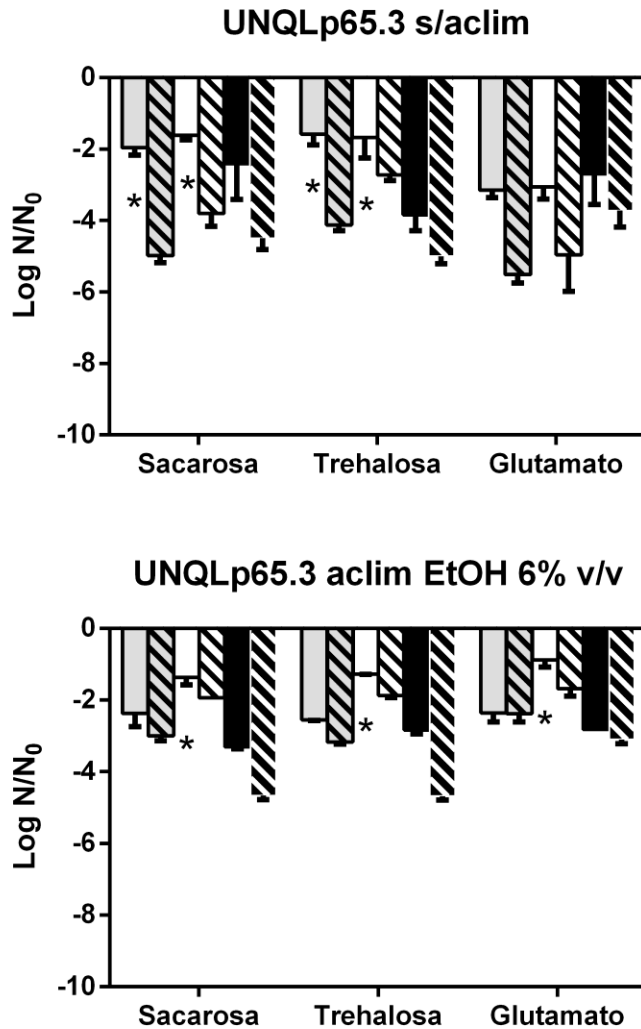


Figura 2.4.1.5. Recuento de bacterias viables de cultivos de la cepa UNQLp65.3 de *Lb. plantarum* (sin aclimatar y aclimatados), luego de distintos procesos de preservación e incubación en vino sintético por 24 h: congelación a -80 °C, a -20 °C ó liofilización, en presencia de sacarosa 20% p/v, trehalosa 20% p/v ó glutamato 2,5% p/v. Para cada crioprotector: las barras grises indican cultivos congelados a -20 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras blancas indican cultivos congelados a -80 °C e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas); las barras negras indican cultivos liofilizados e incubados en vino sintético con etanol 13% v/v (barras sólidas) ó 14% v/v (barras cruzadas). El símbolo (*) indica que no existen diferencias significativas respecto a cultivos frescos (P <0.05).

Considerando los resultados hallados, mostrados en las Figuras 2.4.1.1 a 2.4.1.5, y los descritos en el Capítulo 1, se decidió seleccionar las cepas UNQLp155 y UNQLp11 de *Lb. plantarum*, obtenidas de FML espontáneas de vino Pinot noir, con el propósito de estudiar el comportamiento de cultivos liofilizados de las mismas durante su incubación en un vino estéril.

2.4.2. Rehidratación de cultivos preservados de cepas de *Lb. plantarum*

Cultivos liofilizados y re-hidratados, en diferentes medios, de las cepas UNQLp11 y UNQLp155 se inocularon en vino Pinot noir estéril, que se incubó 21 días, a 21 °C. Durante este tiempo se evaluaron la viabilidad bacteriana y el consumo de ácido L-málico (Figura 2.4.2).

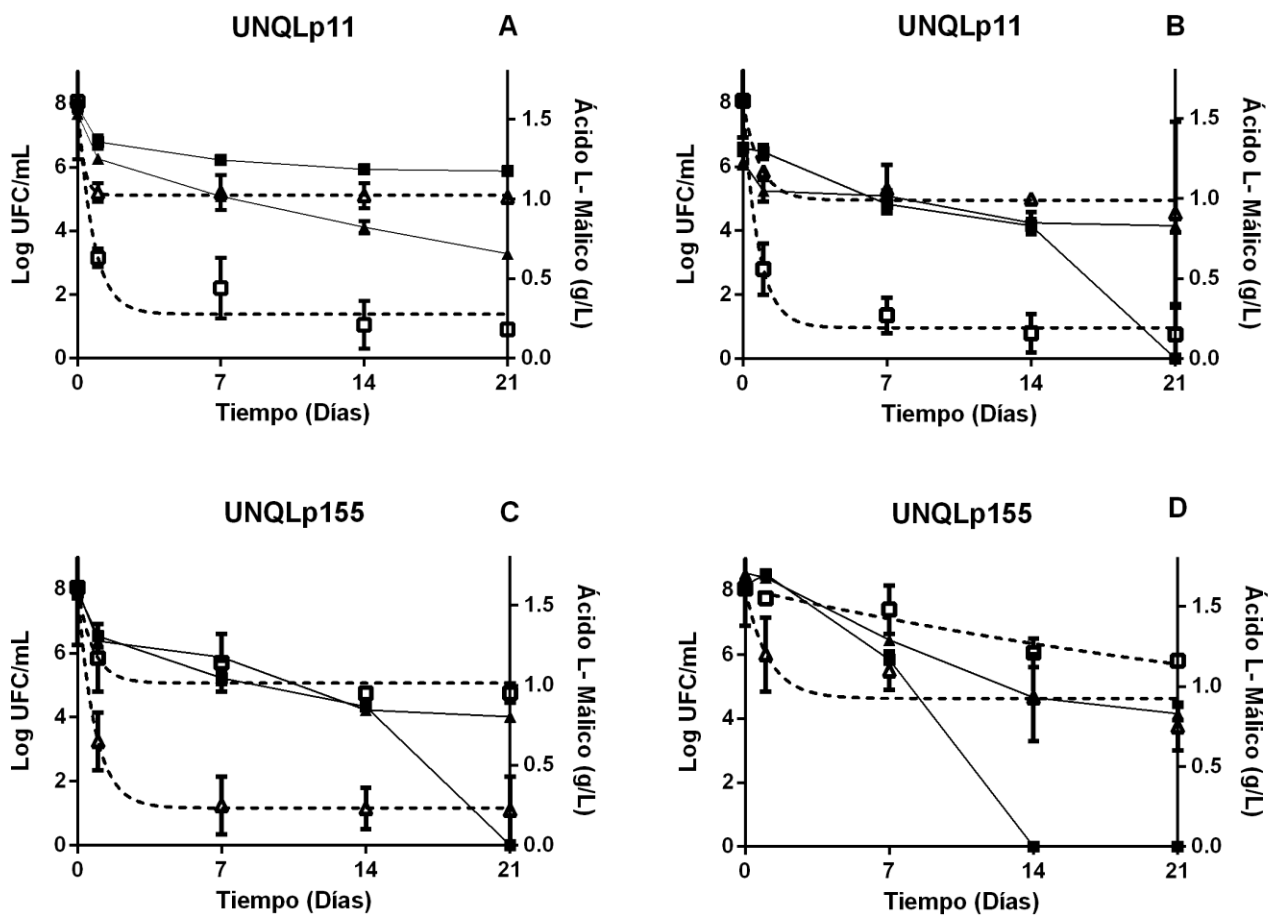


Figura 2.4.2: Recuento de bacterias viables y consumo de ácido L-málico durante la incubación de cultivos de las cepas UNQLp11 y UNQLp155 (aclimatados y liofilizados) en vino Pinot noir estéril, por 21 días a 21 °C. A y C corresponden a cultivos inoculados con el medio de rehidratación, mientras que B y D corresponden a cultivos centrifugados e inoculados sin el medio de rehidratación. Los símbolos sólidos indican log UFC/mL para cultivos rehidratados en solución fisiológica (▲) o en medio de cultivo (■) (MRS). Los símbolos abiertos indican concentración de ácido L-málico para cultivos re-hidratados en solución fisiológica (△) o en medio de cultivo (□). La línea discontinua representa el ajuste de acuerdo con el decaimiento exponencial de una fase.

Se observa que el vino inoculado con el cultivo de UNQLp155 junto con el medio de rehidratación (Figura 2.4.2.C) mostró mayor viabilidad y resultó capaz de consumir una cantidad superior de ácido L-málico. Sin embargo, el comportamiento del cultivo de UNQLp11, inoculado con y sin el medio de rehidratación, resultó similar en ambas condiciones. En general, se observó una mayor viabilidad de los cultivos cuando se rehidrataron en medio de cultivo (caldo MRS o MLO). Sin embargo, el comportamiento de cultivos de UNQLp155 resultó diferente, siendo mayor la viabilidad cuando se rehidrataron en solución fisiológica.

2.4.3. Tolerancia de cultivos de cepas de *O. oeni* a procesos de preservación

En la Figura 2.4.3 se observa la evolución de la viabilidad de cultivos de las cepas UNQOe73.2 y UNQOe31b de *O. oeni*, expuestas a diferentes tratamientos: cultivos liofilizados, congelados a -20 °C y a -80 °C, aclimatados o no, e incubados durante 24 h en vino sintético (etanol 14% v/v), a 21 °C.

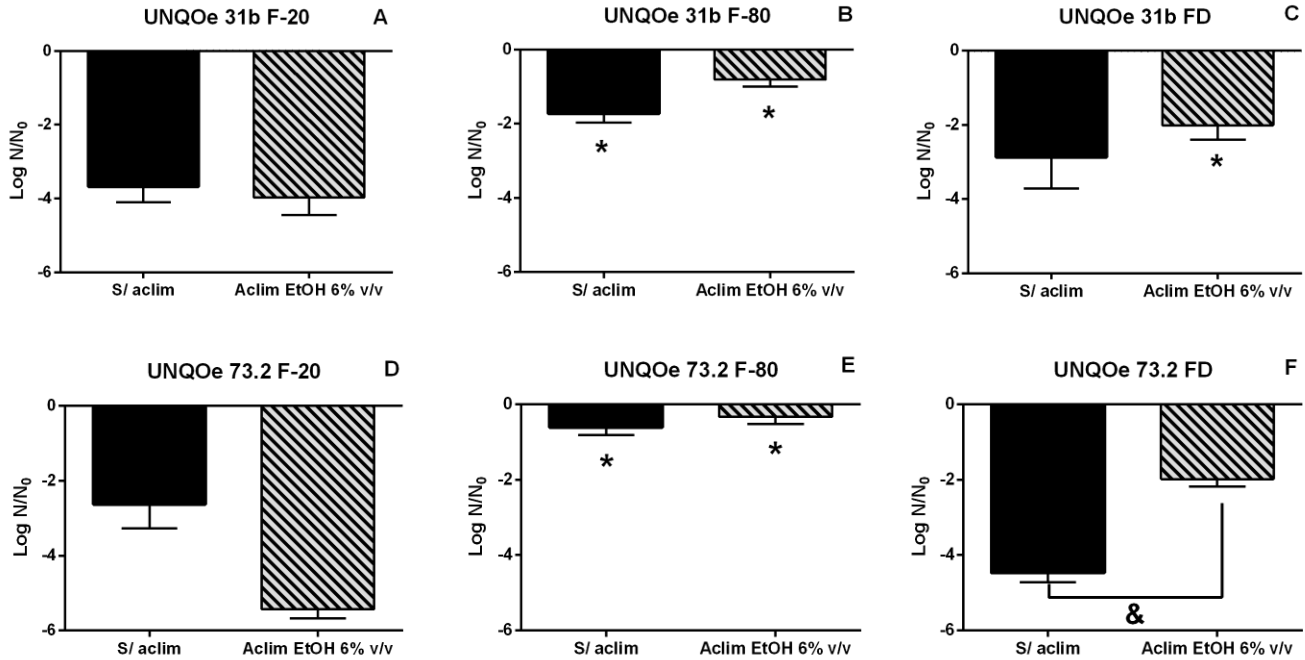


Figura 2.4.3. Número de bacterias viables de cultivos de las cepas UNQOe73.2 y UNQOe31b de *O. oeni* (aclimatados y sin aclimatar), luego de someterlos a procesos de preservación y posterior incubación en vino sintético durante 24 h, a 21 °C. El símbolo (*) indica que existen diferencias significativas respecto a cultivos frescos ($P < 0.05$). El símbolo (&) indica que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuando se empleó trehalosa como crioprotector, ambas cepas de *O. oeni* mostraron ser tolerantes a la liofilización y posterior incubación en vino sintético por 24 h, no observándose diferencias significativas entre los cultivos aclimatados y los no aclimatados. Sin embargo, se registró una menor viabilidad en las condiciones de congelación a -20 °C y en los cultivos liofilizados, siendo particularmente inferior la supervivencia a -20 °C para ambas cepas (~ 4 unidades log). Por el contrario, los cultivos congelados a -80 °C y previamente aclimatados resultaron los más tolerantes al ambiente estresante del vino sintético.

2.4.4. Re-hidratación de cultivos preservados de cepas de *O. oeni*

Se analizaron la viabilidad y la capacidad de consumo de ácido L-málico de cultivos preservados de las cepas UNQOe31b y UNQOe73.2, incubados en vino estéril durante 21 días, a 21 °C, previamente rehidratados en diferentes medios.

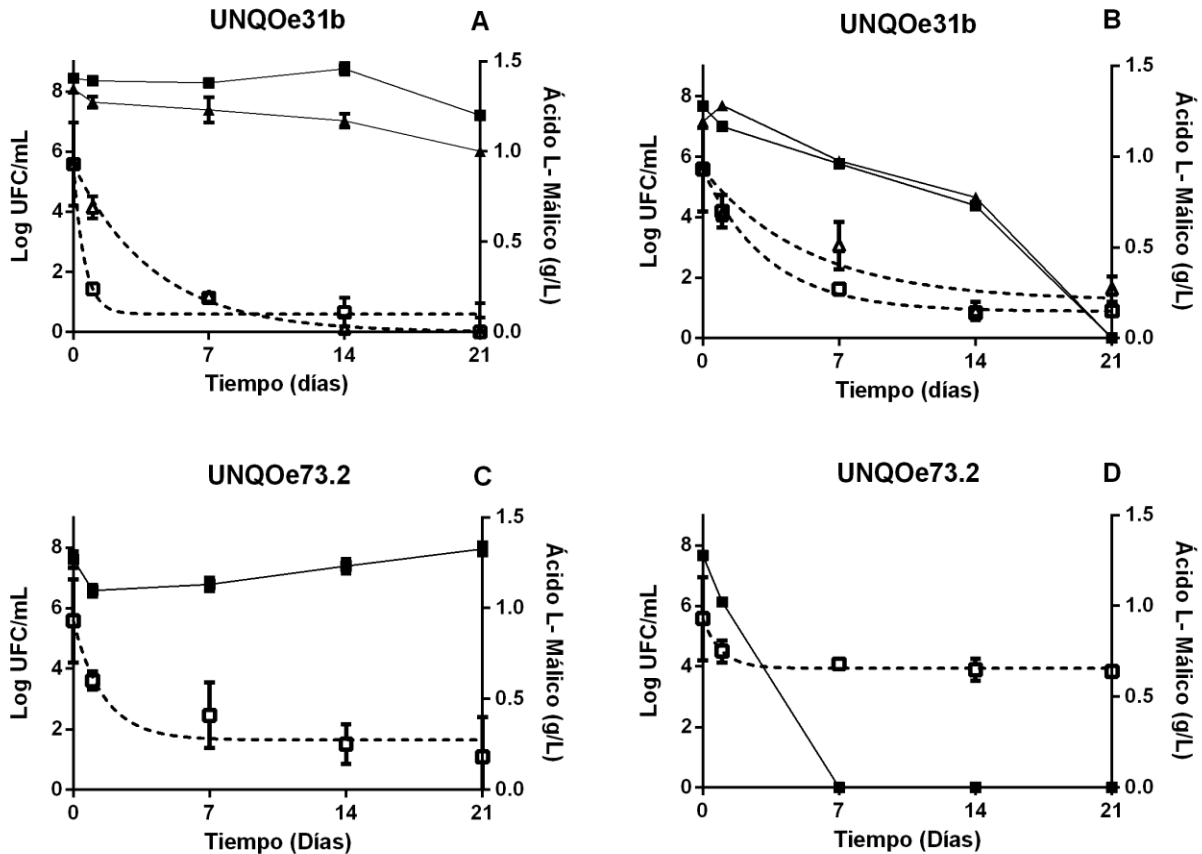


Figura 2.4.4. Recuento de bacterias viables y consumo de ácido L-málico en cultivos de las cepas UNQOe31b y UNQOe73.2 (aclimatados y liofilizados), incubados en vino Pinot noir estéril durante 21 días a 21 °C. A y C corresponden a cultivos inoculados con el medio de rehidratación; B y D a cultivos inoculados sin el medio de rehidratación. Los símbolos sólidos representan el log UFC/mL de cultivos rehidratados en solución fisiológica (▲) ó en medio de cultivo (■) (caldo MLO). Los símbolos abiertos representan la concentración de ácido L-málico de cultivos rehidratados en solución fisiológica (△) ó en medio de cultivo (□). La línea discontinua corresponde al ajuste de acuerdo con el decaimiento exponencial de una fase.

En la Figura 2.4.4 se observa que los cultivos inoculados en vino con el medio de rehidratación (A y C) mostraron mayor viabilidad y mayor consumo de ácido L-málico. Sin embargo, la cepa UNQOe31b mostró similar consumo de ácido L-málico en ambas condiciones, pese a que al inocularla sin medio de rehidratación la viabilidad resultó nula al día 21 (B). También se evidencia, en general, que los cultivos de UNQOe31b presentaron mayor viabilidad cuando se los rehidrató en medio de cultivo (caldo MLO). Sin embargo, los cultivos de la cepa UNQOe73.2, inoculados en vino con o sin el medio de rehidratación, resultaron incapaces de

mantenerse viables cuando se empleó solución fisiológica, pero sí cuando se los rehidrató en medio de cultivo (caldo MLO).

2.5. DISCUSION

Con el fin de evaluar las mejores condiciones de preservación (congelación y liofilización) de cultivos de cepas enológicas de *O. oeni* y de *Lb. plantarum*, con la intención de formular iniciadores malolácticos, se analizaron los efectos de trehalosa, sacarosa y glutamato como crioprotectores, y de tratamientos previos de aclimatación, así como condiciones de rehidratación de los cultivos preservados antes de su inoculación en vino.

Trehalosa, sacarosa y glutamato se han descrito como agentes lioprotectores efectivos en la liofilización de cepas de *O. oeni* y de *Lb. brevis* (Zhao & Zhang 2005), siendo trehalosa el señalado como más eficiente para cepas de *O. oeni* (G-Alegría et al. 2004, Zhao & Zhang 2009, Zhang et al. 2012). Los ensayos desarrollados en este Capítulo muestran que los tres compuestos investigados resultaron eficientes protectores en procesos de congelación y liofilización de cultivos de las cepas patagónicas de *Lb. plantarum*. La supervivencia de los cultivos preservados, durante su incubación en vino, mostró resultar más afectada por el proceso de preservación y de aclimatación previos que por el agente protector empleado. Por el contrario, la preservación de cultivos de cepas de *O. oeni* sí se mostró afectada por el crioprotector elegido, ya que en estudios preliminares no se logró buena recuperación celular cuando se emplearon glutamato o sacarosa como crioprotectores, por lo cual no fueron incluidos en este Capítulo.

Durante la congelación y la liofilización las células se exponen a baja actividad de agua, que puede dañar las estructuras celulares (Tymczyszyn et al. 2007, 2008; Bravo-Ferrada et al. 2015c). Según lo observado, la liofilización resultó el proceso más drástico, con menor recuperación celular que en la congelación. La explicación reside en la deshidratación al vacío a la que se someten las células, la cual expone las envolturas celulares a un entorno hidrofóbico que puede alterar la

permeabilidad de la membrana plasmática de forma más drástica que en la congelación-descongelación (Pembrey et al. 1999; Tymczyszyn et al. 2008).

Los ensayos graficados en las Figuras 2.4.2.1 y 2.4.2.3 indican que la pre-aclimatación de los cultivos en etanol 6% v/v, incrementó su tolerancia a la congelación y la liofilización. Previamente se informó que la aclimatación en concentraciones sub-letales de etanol, de cultivos de cepas de *Lb. plantarum*, conducía a un incremento en los ácidos grasos saturados y a una disminución de la longitud de su cadena. Considerando que la membrana plasmática es el primer blanco del daño en los procesos de preservación, esta modificación en la composición de la membrana podría ser responsable de una mayor recuperación de los cultivos aclimatados, tras los procesos de preservación. Resultados similares fueron hallados por Li et al. (2009b), quienes atribuyeron la mayor recuperación de cultivos de *O. oeni* liofilizados a un mayor contenido en el ácido graso Cyc19:0 en las bacterias crecidas a pH bajo. En este sentido, Maicas et al. (2000) comunicaron que la eficacia de una cepa de *O. oeni* para realizar la FML, luego de su congelación ó liofilización, aumenta si la misma se cultiva previamente en medio de aclimatación o en vino.

La velocidad de congelación es otro factor relacionado con el daño celular; elevadas tasas de secado (congelación a -80 °C) resultan menos nocivas que tasas bajas (-20 °C) (Zhao & Zhang 2009). Esto explica la relación entre la supervivencia de un cultivo bacteriano incubado en vino sintético y el proceso previo de preservación. Incluso cuando el número de células viables no hubiera experimentado una reducción significativa tras la congelación (-20 °C y -80 °C) y la liofilización, la disminución de la supervivencia en la incubación en vino sintético resultó mayor en cultivos congelados a -20 °C ó liofilizados, que en los congelados a -80 °C (Figuras 2.4.2.1 y 2.4.2.3).

En términos generales se observó mayor viabilidad celular en vino sintético conteniendo etanol 13% v/v, en todas las condiciones ensayadas. Esto sugiere que la *performance* de los cultivos en vino depende en gran medida del grado alcohólico del mismo, como quedó demostrado por las diferencias observadas

entre vinos sintéticos conteniendo etanol 13 ó 14% v/v. Se resalta así la importancia crítica del conocimiento previo de los parámetros fisicoquímicos del vino a inocular, que permite decidir el momento más oportuno de inoculación con cultivos malolácticos durante el proceso de vinificación.

Diferentes autores han señalado que cepas de *O. oeni* resultaban capaces de mayor tolerancia a la liofilización cuando se empleaba trehalosa como crioprotector (G-Alegría et al. 2004; Zhao & Zhang 2009). Si bien existen numerosos iniciadores de FML comercializados como cultivos liofilizados, pocos estudios han evaluado el impacto de la inoculación directa en vino de cepas deshidratadas de *O. oeni* (Maicas et al. 2000, Cecconi et al. 2009, Krieger-Weber et al. 2010, Izquierdo Cañas et al. 2013).

La selección de las cepas patagónicas UNQOe73.2 y UNQOe31b de *O. oeni* como candidatos para cultivos malolácticos se basó en sus propiedades enológicas y tecnológicas, en particular su tolerancia al ambiente estresante del vino (Bravo-Ferrada et al. 2016; Brizuela et al. 2017). En este Capítulo se estudió la deshidratación por liofilización y congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de cultivos de dichas cepas y se examinó su viabilidad luego de incubarlos en vino sintético (etanol 14% v/v) por 24 h. Los cultivos liofilizados y los congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostraron mayor supervivencia cuando se aclimataron previamente, mientras que los congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no exhibieron diferencias significativas en la cepa UNQOe31b; el comportamiento de UNQOe73.2 resultó diferente. La aclimatación previa mostró ser beneficiosa para proteger las células de *O. oeni* de los factores de estrés del vino durante el primer día de incubación.

La re-hidratación de cultivos liofilizados constituye un paso crítico para la recuperación celular. Se observó en cultivos liofilizados de cepas de *O. oeni*, que la rehidratación directa en vino conducía a una mortalidad celular de hasta 95% (Davis et al. 1985a). Las células que han sufrido lesiones sub-letales pueden no resultar capaces de reparar el daño si la rehidratación se realiza en condiciones inadecuadas (de Valdez et al. 1985; Theunissen et al. 1993). La composición del medio de rehidratación, su molaridad y las condiciones del proceso pueden afectar

significativamente la tasa de recuperación (Ray et al. 1971; de Valdez et al. 1983). Santos et al. (2014) observaron que inmediatamente después de re-hidratar cultivos liofilizados de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, la mayoría de las células presentaba daños en su membrana. La reparación de ese daño, que ocurrió durante la fase de latencia y demoró 24 h, condujo a un incremento en el número de células viables, alcanzando valores máximos al inicio de la fase logarítmica (70–80% de células viables). Estos valores permanecieron sin cambio hasta la etapa estacionaria temprana.

Los cultivos malolácticos comerciales suelen acompañarse de un activador, cuyo propósito es optimizar la supervivencia celular y favorecer su *performance*. Estos activadores contienen, en general, nutrientes esenciales, vitaminas y sales minerales (magnesio, manganeso), que son co-factores indispensables para la actividad de la enzima maloláctica. En este trabajo, observamos que los cultivos preservados de las cepas ensayadas, a excepción de UNQLp155, exhibían mayor supervivencia y consumo de ácido L-málico cuando se los rehidataba en medio de cultivo conteniendo los nutrientes necesarios para su crecimiento. Asimismo, cuando estos cultivos se inocularon en vino acompañados del medio de rehidratación, su desempeño resultó mejor. De las cuatro cepas ensayadas, UNQLp11 y UNQOe31b lograron consumir un 90% del ácido L-málico del vino sintético cuando se las rehidrató en medio de cultivo, y no mostraron diferencias significativas al inocularlas con ó sin el medio de rehidratación.

2.6. CONCLUSIONES

En este Capítulo se expusieron los ensayos de evaluación de efectos de agentes crioprotectores en los procesos de preservación, y de medios de re-hidratación sobre la viabilidad de cultivos de cepas enológicas patagónicas, dos de *O. oeni* y cinco de *Lb. plantarum*, incubados en vino sintético ó vino estéril.

Optimizar las condiciones de preservación, manteniendo las propiedades tecnológicas de cultivos nativos deshidratados de interés enológico, resulta un insumo substancial para el sector vitivinícola, por su potencial para la obtención de vinos de calidad diferencial, que conserven el *terroir* regional. El éxito de un

proceso de preservación se relaciona con una serie de variables: i- adecuada elección del agente protector, ii- apropiadas condiciones de deshidratación, iii- humedad remanente en el cultivo deshidratado y iv- temperatura de almacenamiento, además de depender de factores intrínsecos de cada microorganismo (Carvalho et al. 2004).

Para todas las cepas de BAL ensayadas se pudo observar que la liofilización y la congelación a -80 °C resultaron los mejores métodos de preservación, y que la aclimatación previa de los cultivos mejoraba su supervivencia en vino.

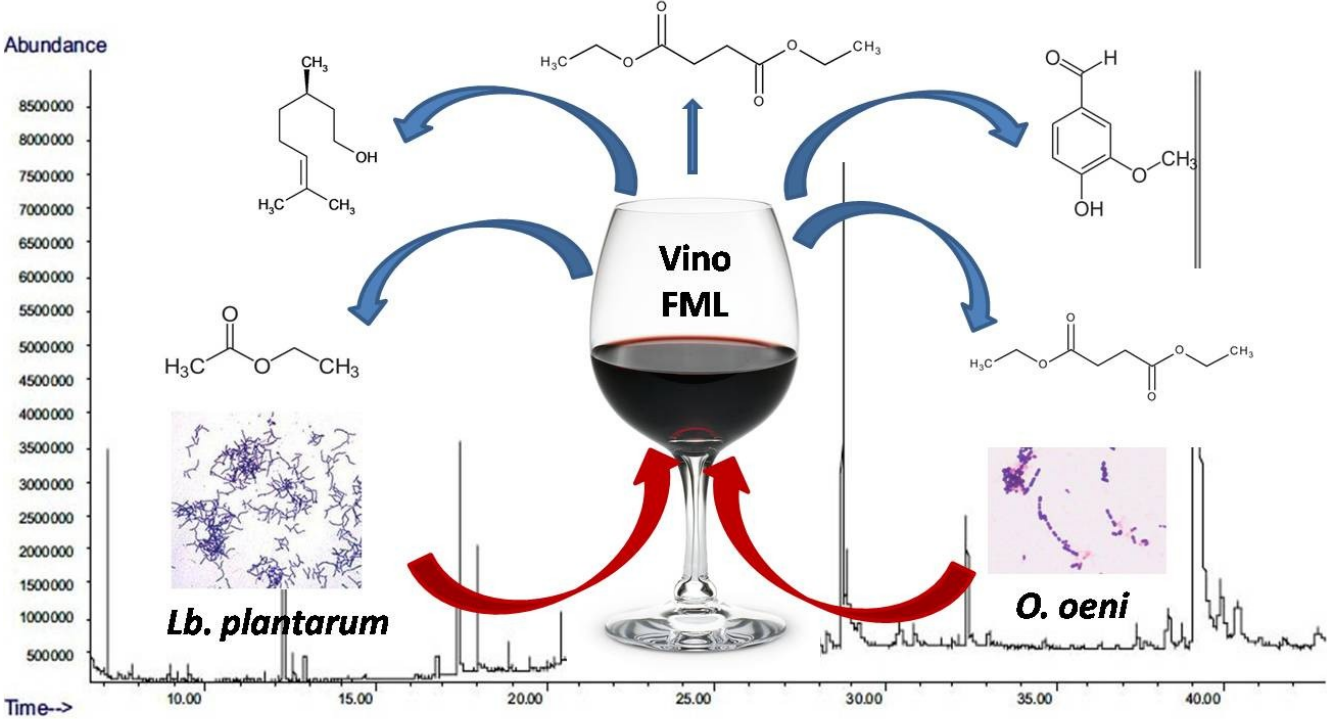
Respecto a la rehidratación, la *performance* de cultivos de las cepas UNQLp11 y UNQOe31b resultó superior cuando se empleó medio de cultivo. Si bien la cepa UNQLp155 se comportó de modo inverso, mostró buen consumo de ácido L-málico al ser rehidratada en solución fisiológica, que sería una alternativa más económica para uso industrial.

Capítulo 3

Análisis de la modificación del perfil de compuestos volátiles en vino Pinot noir incubado con cultivos de cepas patagónicas de *Lb.* *plantarum* y de *O. oeni*

Esquema gráfico

Compuestos volátiles = flavour



3.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha generalizado el empleo de cultivos iniciadores para controlar el proceso de FML y se ofrecen diferentes preparaciones comerciales elaboradas principalmente con cepas de *O. oeni* y con algunas de *Lb. plantarum* (Christian Hansen, Lallemand, Anchor, Wyeast, Scott, etc.). Durante esta fermentación secundaria las BAL metabolizan diferentes ácidos orgánicos, como los ácidos acético, cítrico y tartárico, además del ácido L-málico. El equilibrio entre ácidos orgánicos impacta en el sabor del vino, siendo la conversión total del ácido L-málico en ácido L-láctico la premisa para reducir la acidez y astringencia de los vinos (Volschenk & van Vuuren 2006). Además, ciertas cepas de *O. oeni* y *Lb. plantarum* contienen enzimas que intervienen en rutas metabólicas relacionadas con modificaciones del perfil aromático del vino (Tristezza et al. 2016; Cappello et al. 2017). Si bien se ha documentado la existencia de una amplia variedad de enzimas en BAL enológicas (glucosidasas, esterasas, ácido fenólico descarboxilasas, citrato liasas) (Liu 2002; Ugliano et al. 2003; Matthews et al. 2004; Grimaldi et al. 2005a, b), todavía es limitada la información sobre el rol de sus respectivas actividades durante la fermentación del vino, incluyendo su potencial para mejorar las características organolépticas del mismo (Cappello et al. 2017).

Los glucósidos no volátiles son inodoros y constituyen un importante conjunto de compuestos presentes en uvas, en mosto y en vino, con potencial de contribuir al aroma del mismo. En cepas enológicas de los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* se detectaron actividades glucosidasa capaces de modificar el aroma vínico (Grimaldi et al. 2005a,b). También se detectaron potenciales glucosidasas en genomas de cepas de *O. oeni* (Borneman et al. 2010), y se halló el gen codificante de la β -glucosidasa en varias cepas de BAL (Spano et al. 2005). Olguin et al. 2011, en un trabajo pionero, analizaron la actividad β -glucosidasa y la expresión del gen *bgl* en vino Cabernet sauvignon fermentado con cuatro cepas diferentes de *O. oeni*. Los ensayos en vino se compararon con otros realizados en vino sintético y en mezclas vino - caldo MRS. Estos autores hallaron que la actividad enzimática resultaba variable y dependía de las condiciones del medio.

Respecto a la expresión del gen *bgl*, no observaron correlación con la actividad enzimática y los patrones de expresión variaron entre las cepas ensayadas, independientemente de la condición de cultivo.

También se demostró que los cambios en las concentraciones de ésteres pueden tener influencia en las características organolépticas del vino (Swiegers et al. 2005; Sumbly et al. 2010), siendo responsables del aroma afrutado deseado en vinos jóvenes. Estudios recientes demostraron que las BAL de origen enológico poseen diferentes actividades de síntesis de ésteres, que pueden conducir a un incremento en el contenido de éster etílico, modulando el carácter frutal de uvas tintas (Costello et al. 2013).

El metabolismo del citrato presente en vino conduce a la producción de diacetilo, acetoína, butanodiol y acetato, importantes contribuyentes al aroma y a la complejidad del mismo (Bartowsky & Henschke 2004; Olguín et al. 2009). Los genes relacionados a la utilización del citrato se organizan en el *cluster* de la citrato liasa (genes *citR*, *maeP*, *citC*, *citD*, *citE*, *citF*, *citX* y *citG*) (Mills et al. 2005). El impacto organoléptico del diacetilo en el vino se ha debatido durante años y, en general, los catadores coinciden en que su concentración no debe superar los 5 - 6 mg/L (Davis et al. 1985b), dependiendo de las características propias de cada vino (Martineau & Henick-Kling 1995). A valores inferiores a los señalados se considera que contribuye al bouquet del vino, mientras que en niveles superiores el efecto es negativo. Por estas razones, en numerosas BAL de origen enológico se ha investigado la presencia del gen *citE*, integrante del *cluster* de la citrato liasa (Mills et al. 2005).

Otros compuestos volátiles de importancia en vino son los fenoles. La producción de fenoles volátiles generalmente se asocia con el deterioro producido por contaminación con la levadura *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* (Ribereau-Gayon et al. 2006). Sin embargo, también se ha señalado que algunas especies de *Lactobacillus* son capaces de generar estos compuestos, pero en menor cantidad (Couto et al. 2006). La conversión de compuestos fenólicos en vainillina (compuesto aromático muy potente), se demostró en distintas especies del género *Lactobacillus* (Bloem et al. 2006). Una de las enzimas involucradas en la

producción de compuestos fenólicos es la decarboxilasa de ácido fenólico (PAD), y distintos autores identificaron al gen codificante de esta enzima (*pad*) en cepas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni* (Mtshali et al. 2010, 2012; Lerm et al. 2011).

La variedad Pinot noir es una de las más delicadas entre las tintas, dado que pequeños cambios en el *terroir* producen diferencias importantes en la calidad del vino. Se cultiva en casi todas las provincias vitivinícolas de Argentina siendo Mendoza la que posee mayor superficie (73,7%), seguida por Neuquén (11,4%) y Río Negro (6,5%), en la región patagónica. Es aquí donde este varietal encontró las condiciones agroecológicas óptimas para expresar todo su potencial enológico (Crisóstomo 2007).

En el Laboratorio de Microbiología Molecular, y a partir de FML espontáneas de vinos Pinot noir patagónicos, se aislaron y caracterizaron varias cepas de *Lb. plantarum* y *O. oeni*. Los estudios de tolerancia a factores de estrés, en vino sintético y en vino estéril, así como el hallazgo de ciertas actividades enzimáticas y la detección de genes relacionados con la producción de compuestos aromáticos, nos permitieron seleccionar las cepas con mayor potencial para formular cultivos iniciadores regionales para la FML (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2016; Valdés La Hens et al. 2015; Brizuela et al. 2017).

También se analizaron la presencia del gen codificante de la β -glucosidasa y la actividad β -glucosidasa en cepas seleccionadas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni* (Bravo-Ferrada et al. 2013; Brizuela et al. 2017), y se examinó la existencia de putativos genes *pad* en algunas cepas patagónicas (Brizuela et al. 2017), hallándolo sólo en las de *Lb. plantarum*. La existencia del gen codificante de la subunidad β del complejo citrato liasa (*citE*) se estudió en cuatro cepas patagónicas de *Lb. plantarum* y en cuatro de *O. oeni*, encontrándolo en tres de las primeras y en todas las segundas (Brizuela et al. 2017). Sin embargo, restaba aún analizar el potencial de estas cepas patagónicas para modificar el perfil de compuestos volátiles del vino, substancial en la modulación de sus propiedades organolépticas.

3.2. OBJETIVO

El objetivo de estudio del presente Capítulo consistió en analizar la capacidad de cepas patagónicas seleccionadas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* para modificar el perfil de compuestos volátiles de un vino Pinot noir estéril (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2014, 2016; Brizuela et al. 2017). Con este propósito se analizaron cambios en concentraciones de diferentes compuestos volátiles (alcoholes, ésteres, terpenoides, etc.) y de algunos ácidos orgánicos, principalmente ácido L-málico, antes y después de la fermentación de un vino estéril con estas cepas.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Aclimatación de cultivos

Cultivos en fase estacionaria ($\sim 10^9$ UFC/mL) se centrifugaron a 5000 x g, 10 min y se resuspendieron en igual volumen de medio de aclimatación modificado (50 g/L MRS, 40 g/LD (-) fructosa, 20 g/LD (-) glucosa, 4 g/L L-malato, 1 g/L Tween 80, y 0.1 mg/L piridoxina, ajustado a pH 4.6, suplementado con etanol 6% v/v) (Bravo-Ferrada et al. 2014). En este medio, los cultivos se incubaron por 48 h a 21 °C, de acuerdo con Brizuela et al. (2017).

3.3.2. Ensayos de fermentación

Se seleccionaron las cepas UNQLp11 y UNQLp155 de *Lb. plantarum* y UNQOe31b y UNQOe73.2 de *O. oeni* para realizar ensayos de fermentación, a escala de laboratorio, en vino Pinot noir estéril (etapa final de FA) con la siguiente composición: etanol 14,5% v/v, pH 3.82, <2.00 g/L azúcares residuales, 2 g/L de ácido L-málico, 96 mg/L SO₂ total, y acidez total de 3.98 g/L. El vino se esterilizó por filtración a través de membranas de 0.2 µm de tamaño de poro (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemania). Las células aclimatadas se recogieron por centrifugación, se inocularon ($\sim 5 \times 10^7$ CFU/ml) en 80 ml de vino, que se incubó a 21 °C por 20 días, sin agitación.

3.3 Viabilidad celular y consumo de ácido L-málico

El número de células viables se determinó por recuento en placas de MRS o MLO, según correspondiera. Se tomaron muestras los días 0, 5, 10, 15 y 20.

La concentración residual de ácido L-málico se midió con un kit enzimático (BioSystems SA, Barcelona, España).

Para ajustar la cinética de consumo de ácido L-málico (CAM) se utilizó un modelo de decaimiento exponencial en una fase, aplicando la Ecuación 1 y utilizando el *software* GraphPad Prism® 6.0:

$$[MA_t] = ([MA_0] - [MA_i]) e^{-Kt} + [MA_i] \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde $[MA_t]$ es la concentración de ácido L-málico al tiempo “t”, $[MA_0]$ la concentración inicial de ácido L-málico (~2 g/L en el vino utilizado), $[MA_i]$ la concentración de ácido L-málico a tiempo infinito (asíntota de la curva) y K la constante de decaimiento exponencial.

También se determinó el porcentaje de ácido L-málico consumido (CAM%) a los 20 días, aplicando la Ecuación 2:

$$\text{CAM\%} = 100 - ([MA_t] 100 / [MA_0]) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

3.3.4. Determinación de concentraciones de ácidos orgánicos

Las concentraciones de los ácidos tartárico, cítrico y L-láctico se midieron el día 20 con los kits Enology BioSystems (BioSystems SA, Barcelona, España). Los volúmenes de reactivos empleados se adaptaron para medición en microplaca, como se indica en la Tabla 3.3.4.

Soluciones	Cantidad (L-Láctico)	Cantidad (ác. Cítrico)	Cantidad (ác. Tartárico)
Reactivo A	100 µl	80 µl	100 µl
Reactivo B	25 µl	20 µl	100 µl
Patrón	1,2 µl	3,3 µl	7,5 µl
Blanco	1,2 µl	3,3 µl	7,5 µl
Muestra	1,2 µl	3,3 µl	7,5 µl

Tabla 3.3.4. Volúmenes del kit enzimático empleados para microplaca

La absorbancia correspondiente a los ácidos L-láctico y cítrico se midió a 340 nm, y para ácido tartárico a 480 nm.

3.3.5. *Micro-extracción en fase sólida con headspace (HS-SPME)*

Para la determinación de compuestos volátiles se aplicó la técnica HS-SPME, de acuerdo a protocolos previos (Rodríguez-Bencomo et al. 2011), con modificaciones. Brevemente, se colocaron 8 ml de vino, o solución hidroalcohólica que contenía los compuestos aromáticos, en un vial de espacio de cabeza de 20 ml con 40 µl de los tres estándares internos (3-octanol, metilnonanoato y 3,4-dimetilfenol), y se sellaron con un TFE / Septum de silicona (Supelco, Bellefonte, PA). Las muestras se dejaron en un baño de agua a 40 °C durante 5 minutos antes de la extracción. La extracción se realizó con la exposición de un carboxen-polidimetilsiloxano estable de 85 µm, fibra CAR-DVB-PDMS (Supelco) al espacio libre de la muestra durante 10 minutos a 40 °C y bajo agitación constante (500 rpm). Después de la extracción, la fibra se retiró del vial de muestra y se desadsorbió en el puerto del inyector GC en modo splitless durante 80 minutos. Se analizaron por duplicado seis niveles de concentración de cada compuesto de aroma (2,10, 100, 500, 1000, 5000 µg/L), que cubren los intervalos de concentración esperados en los vinos. Antes de su uso, la fibra se acondicionó siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.3.6 *Cromatografía gaseosa – análisis por espectrometría de masas*

Se utilizó el sistema Agilent 7890A GC (Agilent, Palo Alto, CA, USA) con un inyector split /splitless e interconectado con un espectrómetro de masas Agilent 5975N para el análisis de compuestos volátiles. El inyector se ajustó a 250 °C. El software Agilent MSD Chem Station (versión D.01.02 16) se usó para controlar el sistema. Los compuestos volátiles se separaron en una columna capilar polar DB-Wax (60 m × 0,25 mm i.d. × 0,50 µm de espesor de película) de Agilent (J & W Scientific, Folsom, USA). Se empleó helio como gas portador, a un caudal de 1 ml/min. La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: inicial de 40 °C que se mantuvo durante 5 min y luego se aumentó a 240 °C (4 °C/min), que

se mantuvo durante 15 min. Para el sistema MS, las temperaturas de la línea de transferencia, cuadrupolo y fuente de ionización fueron 270, 150 y 230 °C respectivamente; los espectros de masa de impacto de electrones se registraron con voltajes de ionización de 70 EV y la corriente de ionización fue 10 A. Las adquisiciones se realizaron en modos SCAN (de 35 a 450 amu) y SIM. La identificación máxima se llevó a cabo por analogía de los espectros de masas con los de la biblioteca de masas (Wiley 6.0 y NIST 2.0), y con los de los compuestos de referencia, analizados en las mismas condiciones que las muestras de vino. Los datos cuantitativos se obtuvieron calculando el área del pico relativo (o señal TIC) en relación con la de los tres patrones internos utilizados (3-octanol, metilnonanoato y 3,4-dimetilfenol), dependiendo del compuesto volátil. Las curvas de calibración de cada compuesto se realizaron usando una solución hidroalcohólica (pH 3,6, etanol al 14% v/v) enriquecida con los compuestos de referencia puros comerciales en seis niveles de concentración (2, 10, 100, 500, 1000, 5000 µg/L), cubriendo las soluciones patrón de aroma para la curva de calibración. Las soluciones se prepararon en etanol absoluto de grado HPLC, suministrado por Merck. Los 51 compuestos utilizados fueron: acetato de butilo (123-86-4), hexanoato de etilo (123-66-0), decanoato de etilo (110-38-3) y vainillina (121-33-5) de Merck (Darmstadt, Alemania); acetato de isobutilo (110-19-0), butanoato de etilo (105-54-4), acetato de isopentilo (123-92-2), acetato de hexilo (142-92-7), 1-hexanol (111-27-3), cis-3-hexen-1-ol (928-96-1), octanoato de etilo (106-32-1), furfural (98-01-1), linalool (78-70-6), γ -butirolactona (96-48-0), succinato de dietilo (123-25-1), α -terpineol (98-55-5), β -damascenona (23726-91-2), acetato de 2-feniletilo (103-45-7), geraniol (106-24-1), guayacol (90-05-01), lactona de whisky (39212-23-2), α -ionona (79-77-6) y eugenol (97-53-0) de Sigma-Aldrich; ácido hexanoico (142-62-1) y ácido decanoico (334-48-5) de Scharlau (Barcelona, España) y 4-etil guayacol (2785-89-9) de Lancaster (Eastgate, White Lund, Morecambe, Inglaterra); α -pineno, β -pineno, limoneno, terpinen-4-ol, β -citronelol, nerol, 5-metilfurfural, furfurilalcohol, alcohol bencílico, β -feniletil alcohol, ácido decanoico, 2,3-butanodiona, etil propanoato, 1-butanol, 2-metilbutirato de etilo, trans-3-hexen-1-ol, β -ionona, γ -nonalactona, cinnamato de etilo, 4-etilfenol,

2-metoxi-4-vinilfenol, 2,6-dimetilfenol, vainillato de metilo, vainillato de etilo, acetovanillona, dodecanoato de etilo de Sigma-Aldrich. Estos compuestos se seleccionaron sobre la base del importante rol que cumplen en la definición del aroma, siendo representativos del perfil volátil del vino. La pureza de los estándares de aroma resultó superior al 98%. Todas las soluciones se almacenaron a 4 °C.

3.3.7. Reproducibilidad de los resultados

Los ensayos de fermentación se realizaron con tres cultivos bacterianos independientes y por duplicado. Para los análisis estadísticos se utilizó el *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, 2007). Los promedios se compararon mediante ANOVA de una vía, y si p resultaba $<0,05$ la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

3.4. RESULTADOS

Cultivos de dos cepas patagónicas de *Lb. plantarum* (UNQLp11 y UNQLp155) y de dos de *O. oeni* (UNQOe31b y UNQOe73.2), previamente caracterizados, se utilizaron para realizar los ensayos de fermentación, a escala de laboratorio, durante 20 días, a 21 °C. Los cultivos se aclimataron previamente.

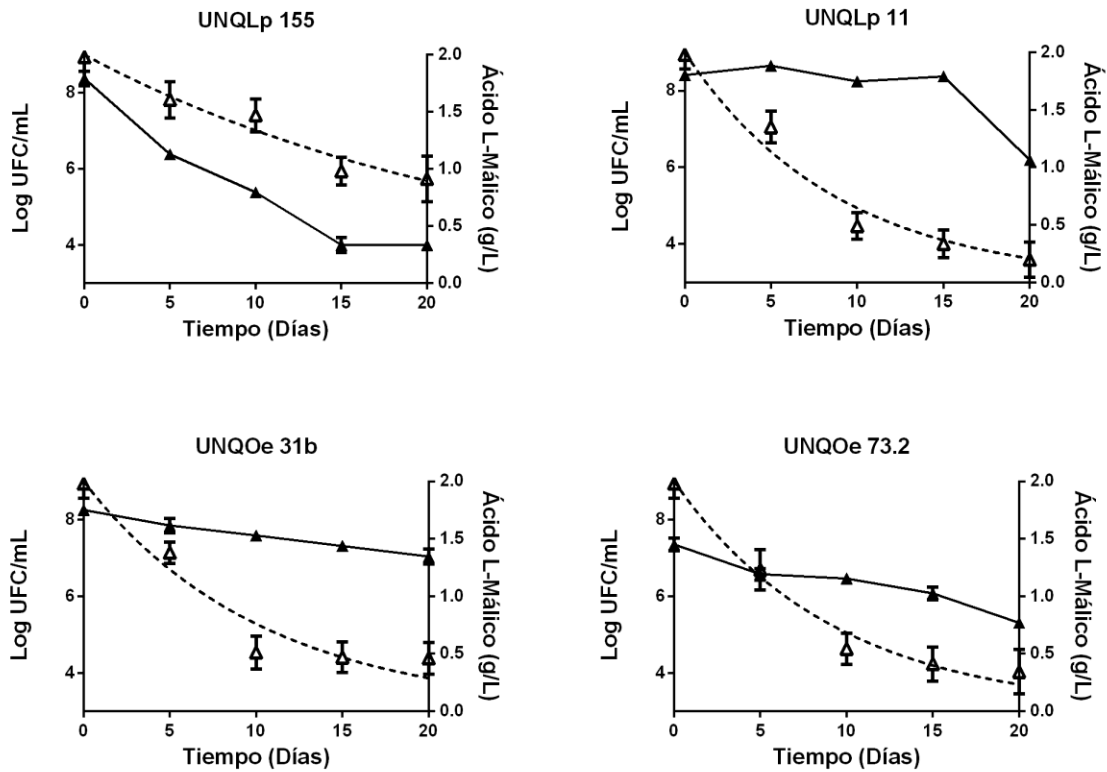


Figura 3.4.1. Recuento de bacterias viables y consumo de ácido L-málico en vino Pinot noir estéril, fermentado 20 días, a 21 °C, por cultivos aclimatados (etanol 6% v/v) de las cepas UNQLp11 y UNQLp155 de *Lb. plantarum* y UNQOe31b y UNQOe73.2 de *O. oeni*. (▲) representan log UFC/mL y (△) representan concentración remanente de ácido L-málico. La línea discontinua indica el ajuste de acuerdo al decaimiento exponencial de una fase.

La Figura 3.4.1 muestra la evolución de la viabilidad y la cinética de consumo de ácido L-málico (CAM). En los cultivos de ambas cepas de *O. oeni* y de UNQLp11 (*Lb. plantarum*) el número de bacterias viables permaneció relativamente constante en los 20 días del ensayo. Los cultivos de estas tres cepas resultaron capaces de consumir el ácido L-málico del vino, siendo su concentración remanente inferior a 0,46 mg/L (Figura 3.4.1). En contraste, los cultivos de la cepa UNQLp155 exhibieron una drástica pérdida de viabilidad celular y un bajo consumo del ácido L-málico del vino.

Tabla 3.4.1. Concentraciones de ácidos L-málico, L-láctico, tartárico y cítrico al día 20 de fermentación del vino.

Cepas BAL	Ácido L-málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Ácido cítrico (mg/L)	Ácido L-láctico (g/L)
Control	1.98 ± 0.12	2.56 ± 0.31	0.11 ± 0.03	1.03 ± 0.07
UNQLp11	0.20 ± 0.15(£)	1.55 ± 0.16	0.15 ± 0.04	2.53 ± 0.09*
UNQOe31b	0.46 ± 0.14(£)	2.06 ± 0.26	0.07 ± 0.09	2.53 ± 0.05*
UNQOe73.2	0.34 ± 0.19(£)	2.04 ± 0.36	0.15 ± 0.07	2.86 ± 0.10*

(£) Significativamente menor respecto al control previo a la FML, (*) significativamente mayor respecto al control previo a la FML. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de ácidos tartárico y cítrico.

La Tabla 3.4.1 muestra los valores de concentraciones de los ácidos L-málico, L-láctico, tartárico y cítrico al día 20 de fermentación del vino estéril, en comparación con un vino estéril no inoculado con BAL. La cepa UNQLp155 de *Lb. plantarum* no se incluyó en este análisis, dada la pérdida de viabilidad exhibida por la misma (Figura 3.4.1). Se observó un notable incremento en la concentración de ácido L-láctico, que provendría de la descarboxilación del ácido L-málico durante la fermentación. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los ácidos cítrico y tartárico (Tabla 3.4.1).

Tabla 3.4.2. Contenido de compuestos volátiles (mg/L) en vino, a los días 0 y 20 de fermentación con cultivos de cepas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni*.

Compuestos aromáticos (mg/L)	Vino inicial	<i>Lb. plantarum</i>		<i>O. oeni</i>	
		UNQLp11	UNQOe 31b	UNQOe 73.2	
Alcoholes					
3-metil-1-butanol	0.89 ± 0.20	1.23 ± 0.28	1.09 ± 0.21	1.39 ± 0.12	
1-butanol	1.06 ± 0.12	1.90 ± 0.63	2.12 ± 0.09	1.01 ± 0.07	
1-hexanol	1.36 ± 0.05	1.47 ± 0.07	1.27 ± 0.01	1.96 ± 0.01 (*)	
Benzil alcohol	0.84 ± 0.03	0.96 ± 0.06	0.64 ± 0.01 (£)	1.16 ± 0.02 (*)	
β-feniletíl alcohol	18.86 ± 0.80	5.68 ± 1.07 (£)	11.52 ± 0.61 (£)	5.43 ± 0.66 (£)	
% alcoholes totales	93.2 ± 1.0	89.8 ± 1.0	90.9 ± 0.9	77.4 ± 1.2	
Ésteres					
Etilpropanoato	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.07	n.d.	
Isobutilacetato	n.d.	n.d.	n.d.	0.04 ± 0.01 (*)	
Etilbutirato	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	
Isoamil acetato	0.47 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.01 (£)	0.64 ± 0.01 (*)	
Etil hexanoato	0.32 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.21 ± 0.01	
Hexil acetato	0.004 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.018 ± 0.020 (*)	0.018 ± 0.023 (*)	
Etil octanoato	0.067 ± 0.003	0.034 ± 0.006 (£)	0.045 ± 0.002 (£)	0.100 ± 0.009 (*)	
Etil decanoato	0.013 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.018 ± 0.001 (*)	0.026 ± 0.001 (*)	
Dietil succinato	0.43 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.85 ± 0.01 (*)	1.94 ± 0.01 (*)	
β-fenil etil acetato	0.046 ± 0.006	0.038 ± 0.003	0.144 ± 0.016	0.046 ± 0.001	
Etildodecanoato	0.0025 ± 0.0028	0.0024 ± 0.0001	0.0021 ± 0.0003	0.0036 ± 0.0006 (*)	
% ésteres totales	6.4 ± 0.5	9.7 ± 0.6	9.0 ± 0.7	20.7 ± 1.0	
Terpenos					
β-citronelol	0.026 ± 0.002	n.d.	n.d.	n.d.	
Fenoles volátiles					
4-etil guaiacol	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.001	n.d.	n.d.	
4-etil fenol	n.d.	0.008 ± 0.001 (£)	n.d.	n.d.	
Otros compuestos					
2,3-butanodiona	n.d.	n.d.	n.d.	1.15 ± 0.06 (*)	
γ-butyrolactona	10.32 ± 0.28	7.58 ± 0.52	6.12 ± 0.01	12.64 ± 0.02	
Furfural	0.061 ± 0.001	0.049 ± 0.003 (£)	0.018 ± 0.001 (£)	0.022 ± 0.001 (£)	

(*): Significativamente mayor respecto al control sin inocular ($p < 0.05$), (£): Significativamente menor respecto al control sin inocular ($p < 0.05$). nd, no detectado

El análisis por cromatografía de gases HS-SPME permitió detectar, en las muestras de vino fermentado, la presencia de 22 compuestos volátiles (Tabla 3.4.2). Se observaron varios cambios en el perfil de volátiles, antes y después de la fermentación con cultivos de las cepas de *Lb. plantarum* y *O. oeni*. Alcoholes y ésteres resultaron los compuestos que evidenciaron los cambios mayores. En la Tabla 3.4.2 puede verse que los alcoholes constituyen los principales compuestos aromáticos en las muestras de vino Pinot noir al final de la FA. Después de la fermentación con cultivos de las cepas UNQLp11, UNQOe31b y UNQOe73.2, se detectó una disminución en la concentración de los mismos junto a un incremento en la concentración de ésteres. En particular, la fermentación con los cultivos lácticos redujo significativamente la concentración de β -fenil alcohol etílico, a niveles por debajo del umbral sensorial (14 $\mu\text{g/L}$) (Ferreira et al. 2000). También se observó una notable disminución en el contenido de furfural.

La fermentación conducida por cultivos de la cepa UNQOe73.2 resultó responsable de las mayores modificaciones en el perfil aromático del vino (Tabla 3.4.2). Se comprobó un incremento en la concentración de ésteres de impacto en el aroma, como acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo. En la fermentación con cultivos de la cepa UNQOe31b se observó un patrón volátil similar en relación al incremento en la concentración de ésteres totales (a excepción del acetato de isoamilo), pero se produjo una disminución en la concentración de los restantes compuestos aromáticos (Tabla 3.4.2). Ambas cepas patagónicas de *O. oeni* resultaron capaces, también, de incrementar la concentración de succinato de etilo en vino.

En los vinos inoculados con la cepa UNQLp11 de *Lb. plantarum*, se observó una disminución en el contenido de compuestos volátiles, si bien la concentración de ésteres totales mostró un incremento respecto al vino inicial (Tabla 3.4.2), sugiriendo que esta cepa posee cierto nivel de actividad esterasa.

Sólo en las muestras de vino fermentado con UNQLp11 pudo detectarse la producción de fenoles volátiles, particularmente baja concentración de etil guaiacol e incremento en la concentración de etil fenol, respecto al vino control. Sin

embargo, los niveles hallados para ambos compuestos volátiles están por debajo de su umbral sensorial (Feng et al. 2017). Si bien la cepa UNQLp11 mostró la presencia de un putativo gen *pad*, y resultó capaz de producir fenoles volátiles en las condiciones de fermentación aplicadas, no se detectó producción de vainillina, y esto podría adjudicarse al límite de detección de la técnica empleada. Además, existen problemas de extracción de este compuesto con la técnica de muestreo de espacio de cabeza (Andujar-Ortiz et al. 2009).

De las cepas analizadas sólo UNQOe73.2 mostró capacidad de producción de diacetilo (2,3 butanediona), en la concentración adecuada para otorgar al vino un agradable olor mantecoso (Bartowsky & Henschke 2004).

Aunque en las tres cepas ensayadas se detectó la presencia del gen *bgl* (β -glucosidasa) (Brizuela et al. 2017), o actividad de β -glucosidasa (Bravo-Ferrada et al. 2016), no se revelaron terpenos en ninguno de los ensayos de fermentación efectuados. Esto podría deberse a una deficiencia del método de extracción aplicado, o a que la expresión génica resultó afectada por factores de estrés abiótico durante los ensayos de fermentación (Grimaldi et al. 2005a, b).

3.5. DISCUSIÓN

Los ensayos de fermentación en vino Pinot noir estéril se realizaron con cepas enológicas patagónicas de *Lb. plantarum* (UNQLp11 y UNQLp155) y de *O. oeni* (UNQOe31b y UNQOe73.2), seleccionadas por sus características enológicas y tecnológicas como potenciales candidatos para formular cultivos malolácticos (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2016; Brizuela et al. 2017). Ambas cepas de *O. oeni* y UNQLp11 de *Lb. plantarum* lograron mantenerse viables y consumir más del 70% del ácido L-málico del vino, en los ensayos de fermentación. La cepa UNQLp155, en cambio, sufrió un descenso abrupto de su viabilidad y sólo resultó capaz de consumir un 50% del ácido L-málico. Esta cepa se había seleccionado por su potencial para formular un cultivo maloláctico, pero los estudios se habían realizado sólo en vino sintético (etanol 14% v/v, pH 3.5) (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2014, 2015b, a, c). Sin embargo, los resultados obtenidos en vino estéril

muestran un comportamiento de UNQLp155 muy inferior al de las otras cepas ensayadas. Esto podría deberse a los diferentes factores de estrés del vino, actuando en forma sinérgica sobre el cultivo inoculado, causando daño celular y pérdida de viabilidad y de funcionalidad.

Cuando se analizaron los cambios en las concentraciones de los ácidos L-málico y L-láctico en los ensayos de fermentación, se observó que el consumo del ácido L-málico por UNQLp11 y por ambas cepas de *O. oeni* se acompañó de un notable incremento en el contenido de ácido L-láctico, respecto a los controles, lo cual se correspondería con una descarboxilación del ácido L-málico para convertirlo en ácido L-láctico, impactando positivamente en el sabor del vino, por reducción de la acidez titulable (Volschenk & van Vuuren 2006).

El examen de compuestos volátiles mediante cromatografía gaseosa permitió comprobar que la fermentación de un vino Pinot noir estéril (etapa final de FA), con cultivos de BAL seleccionadas, producía modificaciones en el perfil de los mismos, siendo alcoholes y ésteres los que exhibieron mayor variación.

La influencia de las BAL en la modificación del perfil volátil del vino ha sido descrita por varios autores (Matthews et al. 2004; Pozo-Bayón et al. 2005; Grimaldi et al. 2005a, b). Las cepas patagónicas UNQLp11, UNQOe31b y UNQOe73.2 resultaron capaces de disminuir la concentración total de alcoholes e incrementar la de ésteres, contribuyendo a resaltar el aroma afrutado propio de vinos Pinot noir (Guinard & Cliff 1987; Girard et al. 1997; Costello et al. 2012; Feng et al. 2017). La concentración del β -fenil alcohol etílico se redujo notablemente, a niveles inferiores al umbral sensorial, con probable atenuación del sabor indeseable a hierbas asociado al mismo. También se redujo el contenido de furfural, disminuyendo las notas de sabor “tipo caramelo” atribuidos a este compuesto (Hale et al. 1999).

La cepa UNQ73.2 mostró la mayor capacidad de modificar el perfil de volátiles del vino estéril, en especial respecto a incrementar la concentración de ésteres con impacto en el aroma. Estos compuestos se han relacionado con notas afrutadas, a plátano, frutilla y pera (Peinado et al. 2004; Sumbly et al. 2010; Tomasino et al. 2015). La cepa UNQOe31b también incrementó los ésteres totales, pero en menor

medida que UNQOe73.2. La evidencia de actividad esterasa en cepas de *O. oeni* ha sido demostrada también por otros autores (Mathews et al. 2004, Pozo-Bayón et al. 2005, Costello et al. 2012). Se han encontrado diferencias significativas en los contenidos de ésteres etílicos entre vinos fermentados por cepas de *O. oeni* o de *Lb. plantarum* (Pozo-Bayón et al. 2005; Lee et al. 2009). Las cepas patagónicas de *O. oeni* resultaron capaces de incrementar la concentración de succinato de etilo, cuya presencia suele ser frecuente después de la guarda del vino en barrica y contribuye a su volumen y redondez, dándole notas cremosas y de café (Tristezza et al. 2016).

A diferencia de lo observado con las cepas de *O. oeni*, la cepa UNQLp11 modificó el perfil aromático disminuyendo las concentraciones de compuestos volátiles, si bien incrementó la de ésteres totales. La presencia de genes codificantes de esterasas en cepas enológicas de *Lb. plantarum* fue señalada por varios autores (Liu 2002; Matthews et al. 2004). Estudios realizados por Mtshali et al. (2010) en cepas de *Lactobacillus* obtenidas de uvas y vinos sudafricanos, mostraron que el 60% de las mismas contenían genes codificantes de esterasas. Si bien estos autores no determinaron actividad enzimática, el hallazgo sugiere la posible implicancia de estas cepas en la síntesis y/o hidrólisis de ésteres.

Pese a que la fermentación del vino Pinot noir estéril con la cepa UNQLp11 condujo a una disminución de la concentración de la mayoría de los volátiles, sólo en estos vinos se pudo detectar fenoles, particularmente una baja concentración de etil guaiacol y un incremento de etil fenol. La presencia de ambos compuestos se ha relacionado con la acción de la levadura *Brettanomyces* durante la FA, pero también se los ha encontrado en ciertas prácticas de elaboración que involucran envejecimiento en barricas de roble, y su presencia se considera perjudicial para el aroma (Rayne & Eggers 2007). Se ha demostrado que algunas especies de *Lactobacillus* pueden producir estos compuestos, en cantidades pequeñas (Couto et al. 2006).

En la cepa UNQLp11 se detectó un putativo gen *pad*, que no se encontró en la UNQOe31b (Brizuela et al. 2017). Si bien la presencia de este gen aún no se

investigó en las cepas UNQLp155 y UNQOe73.2, ninguna de éstas mostró producción de fenoles volátiles en las condiciones ensayadas. Mtshali et al. (2012) detectaron un putativo gen *pad* en dos cepas enológicas de *O. oeni* (de 27 analizadas) procedentes de vinos sudafricanos, y un análisis comparativo de secuencias reveló que los mismos compartían una identidad de 74-80% con especies estrechamente relacionadas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Otro estudio detectó la presencia del gen *pad* en 120 cepas enológicas sudafricanas de *Lactobacillus* (que incluían *Lb. plantarum*), hallando que más del 70% poseía este gen (Mtshali et al. 2010). La presencia o ausencia del gen *pad* en cepas enológicas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni* también fue reportada por Lerm et al. (2011).

Respecto al compuesto diacetilo, sólo se pudo detectar concentraciones capaces de aportar aroma a manteca en los vinos fermentados con cultivos de la cepa UNQOe73.2. Algunas cepas de *Lb. plantarum* no poseen el complejo citrato liasa (Mtshali et al. 2010, 2012) y sería factible que vinos en los cuales la FML fuera conducida por las mismas contuvieran muy bajas concentraciones de diacetilo. Brizuela et al. (2017) demostraron la presencia de uno de los genes del complejo citrato liasa (*citE*) en la mayoría de las cepas patagónicas de *Lb. plantarum* (3 de 4) y de *O. oeni* (4 de 4) ensayadas. Olguín et al. (2009) empleando la cepa PSU-1 de *O. oeni*, analizaron la expresión de genes relacionados con la utilización de citrato, para comprender el rol de esta ruta metabólica en la adaptación bacteriana al ambiente vino y su impacto sobre las características organolépticas del mismo. Realizaron ensayos a distintos pH y concentraciones de etanol, para evaluar la respuesta transcripcional a estos factores de estrés, y hallaron que la expresión de estos genes resultaba más afectada por etanol. Entre los genes estudiados, *citE*, *ackA* y *alsD* mostraron diferente respuesta transcripcional y esto correlacionó con diferente contenido de los productos finales diacetilo y ácido acético. En relación a las cepas enológicas patagónicas estudiadas en este Capítulo, UNQOe73.2 parece resultar la más interesante, dada su capacidad de producir diacetilo.

3.6. CONCLUSIONES

Los resultados de este Capítulo revelaron que la fermentación de un vino Pinot noir estéril, conducida por cultivos de cepas patagónicas seleccionadas de *Lb. plantarum* y *O. oeni*, puede modificar su perfil volátil y la concentración de ácidos orgánicos. Para la selección de las cepas ensayadas, UNQOe31b, UNQOe73.2, UNQLp11 y UNQLp155, se partió de más de 150 aislamientos procedentes de fermentaciones malolácticas espontáneas de vinos Pinot noir, que se identificaron y caracterizaron en sus propiedades enológicas y tecnológicas (Bravo-Ferrada et al. 2013; Valdés La Hens et al. 2015; Brizuela et al. 2017).

En el caso de la cepa UNQLp155 de *Lb. plantarum*, si bien mostró buen desempeño en vino sintético, no resultó capaz de sobrevivir en vino estéril, en las condiciones ensayadas. Por el contrario, la cepa UNQOe73.2 de *O. oeni*, previamente estudiada en vino sintético, mostró buenas capacidades de supervivencia y de consumo de ácido L-málico, además de un excelente potencial para producir ésteres. Respecto a UNQLp11 y UNQOe31b, su comportamiento en vino estéril resultó inferior al exhibido en vino sintético respecto al consumo de ácido L-málico, y también exhibieron menor potencial para reducir las concentraciones de alcoholes e incrementar las de ésteres, que UNQOe73.2. Otra característica positiva de ésta, resultó ser su capacidad de producir un adecuado nivel de diacetilo y una mayor concentración de ésteres frutales, característicos de vinos Pinot noir.

En una próxima etapa resulta necesario realizar ensayos en un entorno relevante, por ejemplo, fermentaciones a escala piloto en vino sin esterilizar, para verificar si ocurren cambios respecto al comportamiento exhibido por estas cepas patagónicas en los ensayos de fermentación en vino estéril y a escala de laboratorio.

Capítulo 4

Inducción de la FML en un vino Malbec no estéril por inoculación de cultivos simples o mixtos de cepas patagónicas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*

4.1. INTRODUCCIÓN

La variedad Malbec, originaria de Cahors, Burdeos, Francia, encontró en Argentina su lugar en el mundo, manifestando todo su potencial y características que la diferencian del resto de las variedades presentes en el país. En Argentina, este varietal se expresa de manera distinta a su lugar de origen y constituye la variedad emblemática en la producción vitivinícola nacional. Exhibe particularidades debidas a las variantes de clima y suelo, las características genéticas de las plantas, el manejo del viñedo y los métodos de elaboración del vino (Informe de variedad Malbec, INV abril 2019).

La superficie sembrada con Malbec ha variado a lo largo de los años, desde 1853, cuando ingresaron al país las primeras plantas de este varietal. Presente en la mayoría de las provincias vitivinícolas de Argentina el Malbec registró, en 2018, un total de 42.999 ha cultivadas, valor que representa el 19,7% del total de vides del país. En el período 2009-2018, la superficie sembrada con Malbec en Argentina aumentó un 50,7% (Informe de variedad Malbec, INV abril 2019). La provincia de Mendoza posee la mayor cantidad de viñedos (85,1%), seguida por San Juan (6,2%) y por el resto de las provincias con 8,7%, entre las que Neuquén aporta 1,5% y Río Negro 0,8%.

Tradicionalmente este vino se elaboraba con uvas cuyo contenido de azúcar era de 22 a 22,5 °Brix, mediante vinificación clásica en piletones de cemento revestidos con epoxi, con maceraciones cortas, FA guiadas por levaduras autóctonas, FML espontáneas, y guarda de a 2 a 3 años en toneles antiguos de roble. Posteriormente y para asegurar la correcta fermentación de los azúcares, se utilizaron diversas cepas de levadura seca comercial y se cambiaron las piletas por tanques de acero inoxidable y los toneles por nuevas barricas de roble francés o americano, logrando así adecuarse a los estándares mundiales. Los vinos así obtenidos poseen un dejo dulzón que los caracteriza, asociado con taninos suaves que responden a la lenta maduración de las uvas en otoños frescos y prolongados. Posee además intenso aroma a frutos rojos y se destaca un especiado de pimienta negra (Catania & Monte 1999). Jofré et al. (2003), analizando el aroma de vinos Malbec, hallaron pocos compuestos aromáticos de

origen primario, deduciendo como probable que los principales compuestos odorantes se encontraban como glucósidos. Se hallaron D-limoneno, terpinelol, cineol, geraniol e isobutil-3-metoxipirazinas.

Como se detalló en el Capítulo 3, la biosíntesis de compuestos aromáticos durante la FML implica una serie de actividades enzimáticas propias de las BAL, como glicosidasas, esterasas, ácido fenólico decarboxilasas y citrato liasas, cuya acción puede modificar las características organolépticas del vino. Diferentes estudios se han centrado en la biosíntesis de compuestos aromáticos durante la FML y sus consecuencias organolépticas (Ugliano et al. 2003; Costantini et al. 2009).

Mejoras en el desarrollo de esta fermentación secundaria y en la calidad final del vino suelen atribuirse a los cultivos iniciadores utilizados (Nielsen & Richelieu 1999; Delaquis et al. 2000). La FML puede ocurrir de forma espontánea; sin embargo, implica riesgos como incremento en la acidez volátil, consumo de azúcares residuales, formación de metabolitos indeseables, incompatibilidad con las levaduras que conducen la FA y mayor duración del proceso. La inoculación con cultivos iniciadores reduce el potencial deterioro por otras BAL y/o bacteriófagos, asegurando un inicio rápido del proceso. Sin embargo, pocas veces se analiza la capacidad de implantación de las cepas inoculadas, con el fin de conocer cuáles son las cepas verdaderamente responsables de este proceso en las bodegas. Para investigar la dinámica de población durante la FML se aplican métodos moleculares que permiten tipificar las cepas. En particular, las técnicas de RAPD-PCR y PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), han facilitado el análisis de las poblaciones de BAL durante el proceso de vinificación.

La mayoría de los cultivos malolácticos comercialmente disponibles están elaborados con cepas de *O. oeni*, por su mejor adaptación al ambiente hostil del vino (Bauer & Dicks 2004; Betteridge et al. 2015). Su actividad metabólica es capaz de mejorar las propiedades organolépticas del mismo mediante la producción de diferentes metabolitos secundarios (Bartowsky 2005; Bartowsky & Borneman 2011). Otras investigaciones se enfocaron en especies alternativas de BAL para conducir la FML, como *Lb. plantarum* (du Toit et al. 2011; Lerm et al. 2011; Bravo-Ferrada et al. 2013, 2014, 2016; Berbegal et al. 2016; Iorizzo et al.

2016; Lucio et al. 2016). Algunas especies del género *Lactobacillus* resultan capaces de sobrevivir en condiciones de vinificación y poseen propiedades biológicas que las convierten en candidatos adecuados para cultivos malolácticos (du Toit et al. 2011; Lerm et al. 2011). Distintas cepas de *Lb. plantarum* han mostrado no producir ácido acético a partir de azúcares y poseer una dotación enzimática diversa con capacidad de originar numerosos compuestos aromáticos (Lee et al. 2009; Mtshali et al. 2010), así como bacteriocinas aptas para limitar la participación de otras BAL durante la FML (Rojo-Bezares et al. 2007; Sáenz et al. 2009). Ya en 1964, Kunkee et al. realizaron ensayos de inducción de la FML en mosto y vino con dos cepas de BAL aisladas de vinos californianos, hallando que la misma resultaba independiente del estadio de la FA al momento de la inoculación. Entre las cepas comparadas, ML34 (*Oenococcus* sp.) produjo una FML más rápida que ML30 (*Lactobacillus* sp.). A fines de la década del '80 se promovió una cepa comercial de *Lb. plantarum* (Viniflora plantarum, CHR Hansen) (Henschke 2003), para inoculación temprana del mosto, antes de la FA (Prahl 1991).

En los últimos años, y a nivel comercial, se dispone de cuatro iniciadores malolácticos formulados con cepas de *Lb. plantarum*. Sin embargo, sólo existen dos cultivos mixtos (*blend*) comerciales, elaborados con cepas de *Lb. plantarum* y *O. oeni* (Duet Arom y Duet Soft, Anchor, Oenobrand), originarias de vinos de Sudáfrica (Lerm et al. 2011). La inoculación de un cultivo mixto tiene la ventaja no sólo de asegurar una mayor velocidad de la FML, sino de aportar a la fermentación el metabolismo propio de cada cepa, logrando un vino de mayor complejidad y *flavour*.

Como se ha mencionado, la FML de vinificaciones tintas patagónicas ocurren espontáneamente y, en Pinot noir y en Merlot, se halló que las especies prevalentes eran *O. oeni* y *Lb. plantarum* (Valdés La Hens et al. 2015). En el Capítulo 3 se analizó el comportamiento de cepas nativas patagónicas seleccionadas cuando se las incubaba en vino Pinot noir estéril, y su capacidad para modificar el perfil de compuestos volátiles del mismo durante la fermentación (Brizuela et al. 2018). Se observó que las cepas de *O. oeni* provocaban una

disminución de los alcoholes totales y un incremento de los ésteres totales, en tanto las cepas de *Lb. plantarum* resultaron más eficaces para consumir el ácido L-málico que para modificar el perfil de volátiles del vino estéril.

4.2. OBJETIVO

El objetivo de estudio del presente Capítulo consistió en analizar el efecto de la inoculación de un vino Malbec no estéril con cultivos simples ó mixtos de cepas nativas patagónicas de *O. oeni* y de *Lb. plantarum* para conducir la FML, investigando modificaciones en el perfil de compuestos volátiles y cambios en el contenido de ácidos orgánicos.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Vino

Se empleó un vino Malbec patagónico, cosecha 2016, en etapa final de FA (etanol 12.4% v/v, pH 3.6, azúcares residuales <2.00 g/L, ácido L-málico 2.8 g/L, SO₂ total 96 mg/L, acidez total 3,98 g/L). La FA se realizó con la cepa patagónica F8 de *Saccharomyces cerevisiae* (Simes et al. 2016).

4.3.2. Cepas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*

Se emplearon las cepas patagónicas UNQLp11 y UNQLp155 de *Lb. plantarum* y UNQOe31b y UNQOe73.2 de *O. oeni*. Las mismas se aislaron de vinos Pinot noir (cosechas 2008 y 2014) y se seleccionaron por sus características tecnológicas y enológicas (Bravo-Ferrada et al. 2013, 2016; Brizuela et al. 2017).

4.3.3. Aclimatación de cultivos

Para el crecimiento bacteriano se emplearon: caldo MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) para cepas de *Lb. plantarum* (De Man et al. 1960) y caldo MLO (Maicas et al. 1999) para cepas *O. oeni*. Cultivos en fase estacionaria temprana (~ 10⁹ UFC/ml) se centrifugaron a 5.000 x g, 10 min y se resuspendieron en igual volumen de medio de aclimatación (50 g/L MRS, 40 g/L D (-) fructosa, 20 g/L D (-) glucosa, 4 g/L L-malato, 1 g/L Tween 80, y 0.1 mg/L piridoxina, ajustado a pH 4.6 y

adicionado de etanol 6% v/v) (Bravo-Ferrada et al. 2014). En este medio las bacterias se incubaron 48 h, a 21 °C, según Brizuela et al. (2017).

4.3.4. Ensayos de vinificación a escala de laboratorio

Los cultivos aclimatados se centrifugaron, se resuspendieron en caldo y se inocularon ($\sim 5 \times 10^7$ UFC/ml) en 80 ml de vino para inducir la FML, como cultivos simples (UNQLp11, UNQLp155, UNQOe31b y UNQOe73.2) ó mixtos (UNQLp11 + UNQOe31b, UNQLp11 + UNQOe73.2, UNQLp155 + UNQOe31b y UNQLp155 + UNQOe73.2). Las muestras de vino se incubaron a 21 °C, 14 días. En el caso de los cultivos mixtos se inoculó la mitad de concentración de cada cepa, de modo de alcanzar un inóculo final de $\sim 5 \times 10^7$ UFC/ml. La muestra control consistió en vino Malbec no inoculado, incubado en iguales condiciones. Los valores de supervivencia celular se determinaron por recuento de viables en placa de agar MRS (*Lb. plantarum*) ó de MLO (*O. oeni*), conteniendo 100 mg/L de cicloheximida (Sigma, USA) y 20 mg/ml de nistatina (Sigma-Aldrich, Argentina) para evitar el crecimiento de levaduras y hongos.

4.3.5. Capacidad de implantación de los cultivos inoculados

Se determinó mediante RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990) con el *primer* M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Huey & Hall 1989).

De cada muestra, a los días 0 y 14 de la FML, se seleccionaron entre cinco y diez colonias al azar (con diferencias morfológicas) de placas MLO y/o de MRS, que se inocularon en caldo MLO o MRS para obtener DNA de cada una. Previamente, se controló que fuesen Gram-positivas, catalasa negativas y se observó su morfología. La extracción de DNA se realizó según Bravo-Ferrada et al. (2011), se cuantificó con espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, 1000) y se controló su integridad y la ausencia de RNA por electroforesis en gel de agarosa 1,0% (p/v). Las reacciones de amplificación se realizaron según Delfederico et al. (2006) y los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2,0% (p/v), con un *ladder* de 100 pb (Productos Bio-Lógicos, UNQ). La evaluación de la

capacidad porcentual de implantación de las cepas se realizó por comparación de los perfiles RAPD de cada colonia seleccionada con los perfiles RAPD de cada cepa inoculada. En base a la presencia o ausencia del patrón RAPD de cada cepa en el total de colonias analizadas, se estimó el porcentaje de implantación de las mismas en cada muestra.

4.3.6. Determinación de concentraciones de ácidos orgánicos

En cada muestra de vino, inoculado o control, los días 0 y 14 de la FML, se determinaron las concentraciones de los ácidos L-málico, tartárico, cítrico y L-láctico, mediante los kits correspondientes de *Enology BioSystems* (Barcelona, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se detalló en el ítem 3.3.4.

4.3.7. Micro-extracción en fase sólida con headspace (HS-SPME)

La extracción de compuestos volátiles por HS-SPME y la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, se realizaron como se indicó en los ítems 3.3.5 y 3.3.6.

4.3.8. Reproducibilidad de los resultados

Se realizaron tres ensayos independientes de vinificación, inoculados con cultivos simples o mixtos, y de cada muestra las medidas se efectuaron, al menos, por duplicado. Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, USA, 2007). Los datos se expresaron como media \pm SD y se compararon mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey o Dunnett para comparaciones múltiples. Si p resultaba $<0,05$ la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

4.4. RESULTADOS

La caracterización previa de las cepas patagónicas de *Lb. plantarum* (UNQLp11 y UNQLp155) y de *O. oeni* (UNQOe31b y UNQOe73.2) se realizó en vino sintético y en vino estéril. Estas cepas se inocularon, como cultivos simples o mixtos, en

muestras de vino Malbec patagónico no estéril, en etapa final de FA, con el objetivo de analizar su capacidad para inducir la FML en presencia de la microbiota propia del vino y del cultivo iniciador de FA utilizado (cepa nativa F8 de *S. cerevisiae*).

Los recuentos de células viables en las muestras de vino Malbec, al día 0 de incubación, resultaron de $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL para miembros del género *Lactobacillus* y de $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL para *O. oeni*.

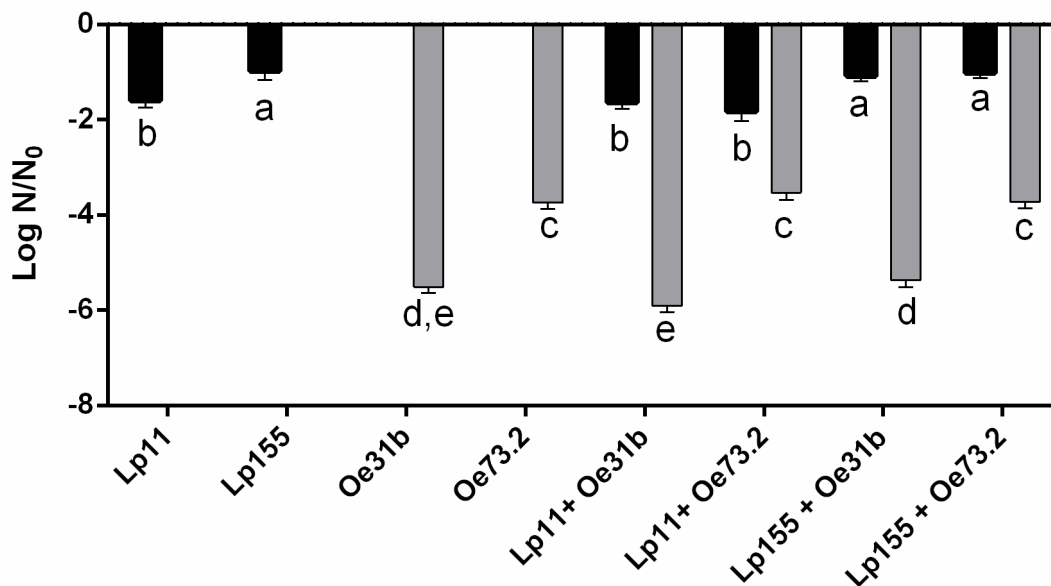


Figura 4.4.1. Viabilidad expresada como log N/N₀ de cultivos simples de las cepas UNQLp11, UNQLp155, UNQOe31b, UNQOe73.2 y mixtos UNQLp11+UNQOe31b, UNQLp11+UNQOe73.2, UNQLp155+UNQOe31b y UNQLp155+UNQOe73.2, al día 14 de incubación del vino Malbec no estéril, a 21 °C. Las barras grises indican recuento de viables en placa correspondientes a *O. oeni*; las barras negras indican recuentos de viables correspondientes a miembros del género *Lactobacillus*. El vino control no mostró disminución significativa de viables de *Lactobacillus* respecto al día 0, no detectándose colonias de *O. oeni*. Los datos se presentan como media \pm SD y se compararon mediante ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferentes letras (a, b, c, d, y e) indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

La Figura 4.4.1 muestra la pérdida de viabilidad celular cuando cultivos simples ó mixtos se inocularon ($\sim 5 \times 10^7$ UFC/mL) en vino Malbec no estéril, que se incubó 14 días a 21 °C. Los valores de recuentos de colonias de la especie *O. oeni* mostraron una disminución de entre 4 y 6 unidades log, siendo la inoculación de

cultivos de UNQOe31b la que mostró mayor descenso de viabilidad. La inoculación de cultivos simples de la cepa UNQLp11 de *Lb. plantarum* causó menor disminución de la viabilidad de lactobacilos, que no excedió las 2 unidades log. Este descenso resultó significativamente menor cuando se inocularon cultivos de UNQLp155.

En la inoculación de cultivos mixtos se observó igual comportamiento que en el caso de los cultivos simples. Los cultivos mixtos conteniendo la cepa UNQOe31b exhibieron mayor pérdida de viabilidad, mientras que los cultivos que contenían cepas de *Lb. plantarum* mantuvieron una viabilidad similar a la de los cultivos simples. En la muestra de vino control (no inoculada), sólo pudieron detectarse colonias de lactobacilos al día 14, indicando que los oenococos no lograron sobrevivir este tiempo.

La capacidad de implantación de los cultivos inoculados en vino Malbec no estéril se verificó mediante RAPD-PCR con el *primer* M13. El porcentaje de implantación se calculó en relación a la cantidad de perfiles iguales al de la cepa inoculada en relación al total de perfiles diferentes presentes en las muestras (Anexo 1).

Tabla 4.4.1. Capacidad porcentual de implantación de las cepas inoculadas, determinada por RAPD-PCR con el *primer* M13.

Cepas de BAL	Total colonias analizadas		(+ MRS	(+ MLO	% implantación
	MRS	MLO			
UNQLp155	7	-	3	-	43%
UNQLp11	8	-	2	-	25%
UNQOe31b	-	9	-	5	55%
UNQOe73.2	-	9	-	2	23%
UNQLp11 + UNQOe31b	8	8	1	5	UNQOe31b (63%) + UNQLp11 (12.5%)
UNQLp11 + UNQOe73.2	5	5	2	2	UNQOe73.2 (40%) + UNQLp11 (26%)
UNQLp155 + UNQOe31b	8	5	2	3	UNQOe31b (60%) + UNQLp155 (25%)
UNQLp155 + UNQOe73.2	6	8	2	3	UNQOe73.2 (37%) + UNQLp155 (33%)

En la Figura 4.4.2 se muestran los cambios en las concentraciones de los ácidos orgánicos L-málico, L-láctico, tartárico y cítrico, entre los días 0 y 14 de los ensayos de vinificación. La inoculación de los cuatro cultivos simples mostró un significativo consumo del ácido L-málico. En las muestras inoculadas con el cultivo simple de UNQLp155, y con los mixtos conteniendo esta cepa, se detectaron las mayores reducciones del contenido de ácido L-málico (Figura 4.4.2A). La muestra control no mostró una reducción significativa del mismo, pudiendo resultar indicativo de una dificultad o un retraso de la FML conducida por la microbiota nativa, o de un eventual problema de compatibilidad entre ésta y el cultivo iniciador de FA empleado (cepa nativa F8 de *S. cerevisiae*).

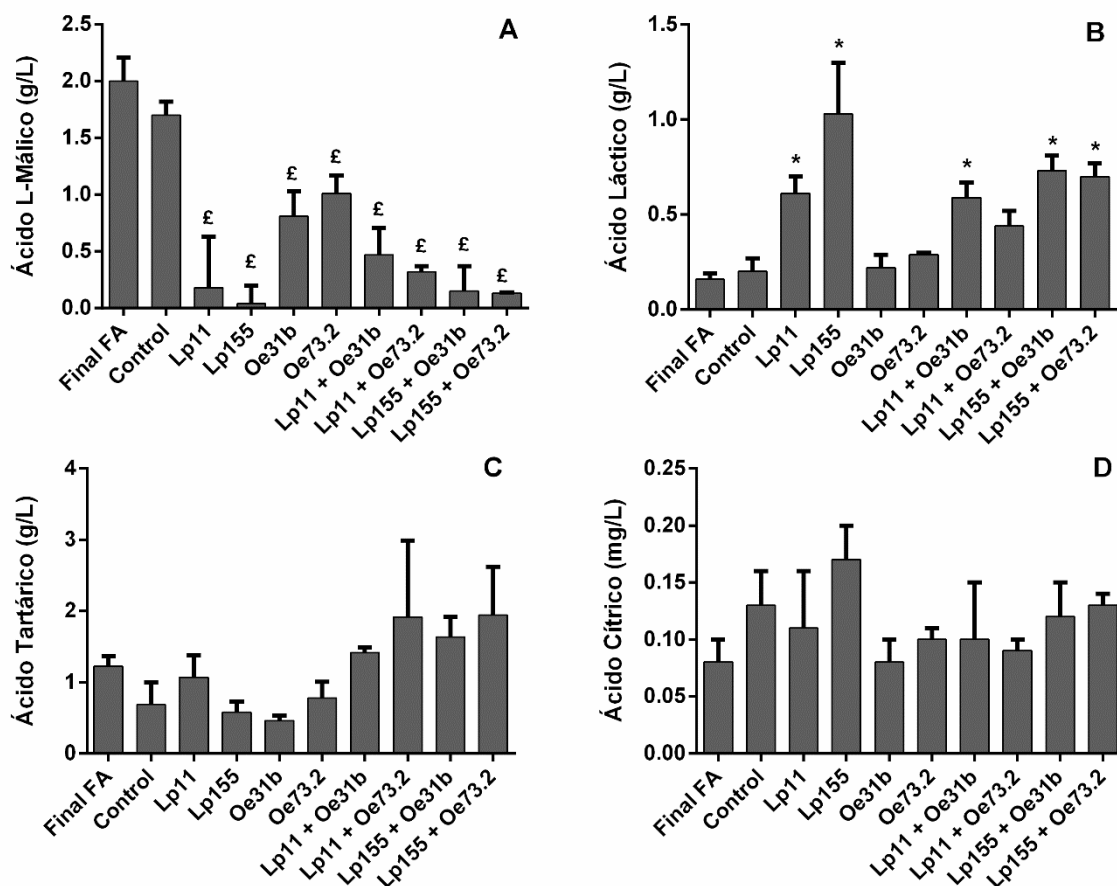


Figura 4.4.2. Concentración residual de ácidos L-málico (A), tartárico (C) y cítrico (D), y producción de ácido L-láctico (B), al día 14 de incubación de las muestras de vino, a 21 ° C. FA final se refiere al vino al día 0 del ensayo. Control: muestra de vino no inoculado e incubado en iguales condiciones, al día 14. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar y se compararon mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. (£) indica significativamente menor al control previo a la FML ($P < 0.05$); (*) indica significativamente mayor al control previo a la FML ($P < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los ácidos tartárico y cítrico ($P > 0.05$).

Con respecto al incremento en el contenido de ácido L-láctico (Figura 4.4.2B), sólo las muestras de vino inoculadas con cultivos simples de las cepas de *Lb. plantarum* (UNQLp11 y UNQLp155) ó con cultivos mixtos incluyendo dichas cepas (UNQLp11 + UNQOe31b, UNQLp155 + UNQOe31b y UNQLp155 + UNQOe73.2) exhibieron un incremento significativo en este ácido, al día 14. Si bien en las

muestras de vino inoculadas con el cultivo simple de UNQOe73.2 ó con el cultivo mixto UNQLp11 + UNQOe73.2 se observó un consumo del ácido L-málico del 50 y 85%, respectivamente, el incremento de la concentración del ácido L-láctico no resultó significativo. Además, debe observarse que en la muestra control (Final FA) (Figura 4.4.2B) se detectó la presencia de ácido L-láctico, lo cual podría indicar que el vino ya había iniciado la FML espontánea al momento de realizar los ensayos de laboratorio. Respecto a los cambios en los contenidos de ácidos tartárico (Figura 4.4.2C) y cítrico (Figura 4.4.2D), si bien parecen mostrar variaciones notables, los valores no resultaron significativos con ninguno de los cultivos inoculados ($p > 0.05$).

Tabla 4.4.2. Contenido de compuestos volátiles (mg/L) en muestras de vino fermentadas por cultivos simples, al día 14 de incubación.

Compuestos Aromáticos (mg/L)	Vino control	<i>Lb. plantarum</i>		<i>O. oeni</i>	
		UNQLp11	UNQLp155	UNQOe31b	UNQOe73.2
Alcoholes					
3-metil-1-butanol	1.56 ± 0.18	0.71 ± 0.02(£)	0.48 ± 0.02(£)	0.53 ± 0.01 (£)	0.59 ± 0.03(£)
1-butanol	4.28 ± 0.10	1.58 ± 0.07(£)	nd(£)	1.07 ± 0.02(£)	1.14 ± 0.02(£)
1-hexanol	3.78 ± 0.06	1.09 ± 0.02(£)	0.81 ± 0.01(£)	0.95 ± 0.05(£)	1.09 ± 0.17(£)
Benzil alcohol	Nd	0.12 ± 0.14	0.12 ± 0.01	nd	nd
β-fenil etil alcohol	9.84 ± 0.09	8.93 ± 0.45	7.74 ± 0.19	10.01 ± 0	9.93 ± 1.35
Ésteres					
Isobutil acetato	0.44 ± 0.05	0.11 ± 0.01(£)	0.08 ± 0.01(£)	0.09 ± 0.01(£)	0.10 ± 0.01(£)
Etil butirato	1.33 ± 0.07	0.37 ± 0.03(£)	0.29 ± 0.01(£)	0.31 ± 0.03(£)	0.35 ± 0.07(£)
Isoamil acetato	3.59 ± 0.15	0.99 ± 0.04(£)	0.78 ± 0.01(£)	1.01 ± 0.24(£)	1.24 ± 0.48(£)
Etil hexanoato	1.97 ± 0.11	0.80 ± 0.02	0.72 ± 0.05(£)	0.87 ± 0.09	1.04 ± 0.32
Hexil acetato	0.03 ± 0.08	0.01 ± 0	0.02 ± 0.01	0.017 ± 0	0.023 ± 0
Etil octanoato	1.45 ± 0.05	0.76 ± 0.04	0.07 ± 0.01(£)	0.82 ± 0.03	0.46 ± 0.46(£)
Etil decanoato	1.79 ± 0.17	0.74 ± 0.01(£)	0.06 ± 0.03(£)	0.748 ± 0.06(£)	0.43 ± 0.49(£)
Dietil succinato	0.73 ± 0.15	0.49 ± 0.02	5.46 ± 0.31(*)	5.95 ± 0.11(*)	6.44 ± 0.20(*)
Etil dodecanoato	0.25 ± 0.08	0.26 ± 0.01	0.04 ± 0.01(£)	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0
Terpenos					
β-citronellol	nd	0.02 ± 0 (*)	nd	nd	0.02 ± 0.02 (*)
Otros compuestos					
2,3-butanodiona	1.33± 0.17	nd (£)	nd (£)	nd (£)	nd (£)
γ-butyrolactona	9.99 ± 0.21	7.72 ± 0.81	7.31± 1.93	7.62± 1.44	8.20 ± 1.35
Furfural	0.09± 0.03	0.04 ± 0(£)	0.03 ± 0(£)	0.04 ± 0(£)	0.04 ± 0(£)

(*): Significativamente mayor respecto al control, previo a la FML ($P < 0.05$), (£): Significativamente menor respecto al control, previo a la FML ($P < 0.05$). nd: no detectado. El vino control es el no inoculado.

Tabla 4.4.3. Contenido de compuestos volátiles (mg/L) en muestras de vino fermentadas por cultivos mixtos, al día 14 de incubación.

Compuestos Aromáticos (mg/L)	Vino control	<i>Cultivos mixtos Lb. plantarum + O. oeni</i>			
		UNQLp11 + UNQOe31b	UNQLp11 + UNQOe 73.2	UNQLp155 + UNQOe 31b	UNQLp155 + UNQOe 73.2
Alcoholes					
3-metil-1-butanol	1.56± 0.18	0.58 ± 0.11(£)	0.65 ± 0.05(£)	0.54 ± 0.07(£)	0.77 ± 0.21(£)
1-butanol	4.28± 0.06	1.22 ± 0.09(£)	1.42 ± 0.15(£)	1.145± 0.15(£)	1.73 ± 0.40(£)
1-hexanol	3.78± 0.10	1.12 ± 0.40(£)	1.06 ± 0.07(£)	0.98 ± 0.01(£)	1.184 ± 0.15(£)
Benzil alcohol	nd	0.22 ± 0.07	0.20 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.04
β-fenil etil alcohol	9.84± 0.09	8.88 ± 1.06	8.64 ± 1.61	9.11 ± 0.56	9.33 ± 0.27
Ésteres					
Isobutil acetato	0.44 ± 0.05	0.13 ± 0(£)	0.10 ± 0.01(£)	0.08 ± 0(£)	0.10 ± 0(£)
Etil butyrato	1.33 ± 0.07	0.36 ± 0.15(£)	0.32 ± 0.02(£)	0.30 ± 0.02(£)	0.37 ± 0.04(£)
Isoamil acetato	3.59 ± 0.15	0.90 ± 0.34(£)	0.83 ± 0.08(£)	0.73 ± 0.02(£)	1.19 ± 0.39(£)
Etil hexanoato	1.97 ± 0.11	0.98 ± 0.28	0.86 ± 0.22	0.93 ± 0.12	0.97 ± 0.32
Hexil acetato	0.03 ± 0.08	0.02 ± 0	0.01 ± 0	0.01 ± 0	0.02 ± 0
Etil octanoato	1.45 ± 0.05	0.84 ± 0.28	0.83 ± 0.16	1.13 ± 0.15	0.77 ± 0.17
Etil decanoato	1.79 ± 0.17	0.93 ± 0.07(£)	0.86 ± 0.01(£)	0.96 ± 0.02(£)	0.92 ± 0.28(£)
Dietil succinato	0.73 ± 0.15	2.98 ± 1.02	6.45 ± 1.75(*)	7.56 ± 1.56(*)	12.11 ± 1.29(*)
Etil dodecanoato	0.25 ± 0.08	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Otros compuestos					
2,3-butanodiona	1.33± 0.17	nd(£)	nd(£)	nd(£)	nd(£)
γ-butyrolactona	9.99± 0.21	nd(£)	6.91± 1.10	7.51± 0.50	7.55± 2.50
Furfural	0.09± 0.03	0.03 ± 0.005(£)	0.04 ± 0(£)	0.04 ± 0(£)	0.04 ± 0(£)

(*): Significativamente mayor respecto al control, previo a la FML ($P < 0.05$), (£): Significativamente menor respecto al control, previo a la FML ($P < 0.05$). nd: no detectado. El vino control es el no inoculado.

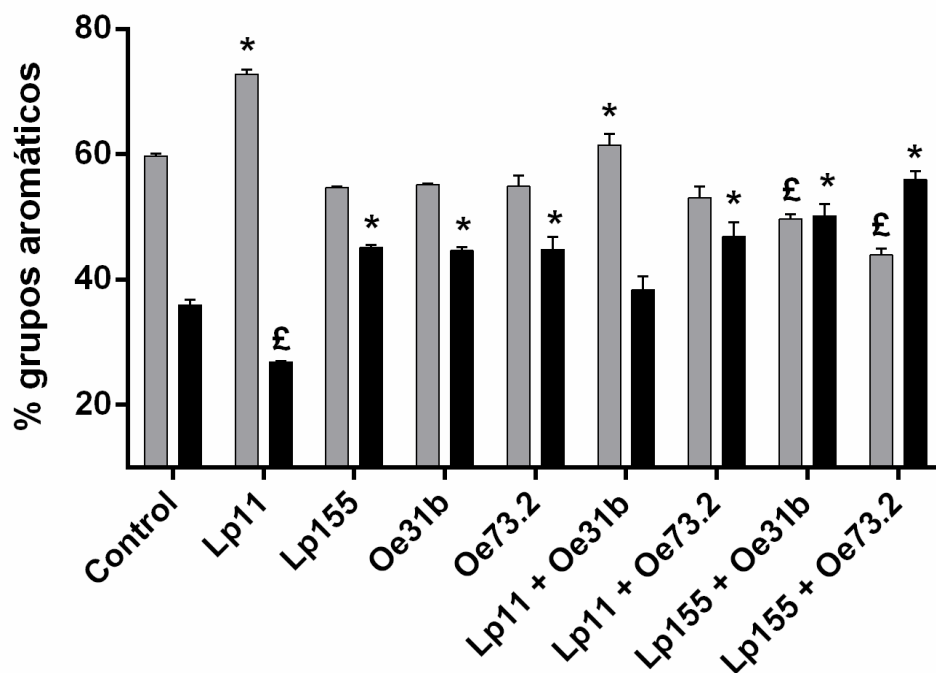


Figura 4.4.3. Cambios en la concentración porcentual de alcoholes totales (barras grises) y de ésteres totales (barras negras) en muestras de vino Malbec inoculadas con cultivos simples de las cepas UNQLp11, UNQLp155, UNQOe31b y UNQOe73.2, y con los cultivos mixtos UNQLp11+UNQOe31b, UNQLp11+UNQOe73.2, UNQLp155+UNQOe31b y UNQLp155+UNQOe73.2, o no inoculadas (control). (£) indica significativamente menor al control, previo a la FML; (*) indica significativamente mayor al control, previo a la FML.

Mediante HS-SPME se analizaron las modificaciones en el perfil de compuestos volátiles de las muestras de vino Malbec. Se estudiaron los cambios en las concentraciones de 5 alcoholes, 9 ésteres, 1 terpeno y otros 3 compuestos volátiles, entre los días 0 y 14 del ensayo de vinificación (Tablas 4.4.1 y 4.4.2, Figura 4.4.3). Los alcoholes resultaron los principales compuestos volátiles en las muestras de vino al día 0 del ensayo. Si bien en las muestras inoculadas con los diferentes cultivos se observó una disminución en las concentraciones de 3-metil-1-butanol, 1-butanol y 1-hexanol, el porcentaje de alcoholes totales sólo disminuyó cuando la FML se indujo por inoculación del cultivo simple de UNQLp155 y de los cultivos mixtos UNQLp155 + UNQOe31b y UNQLp155 + UNQOe73.2, exhibiendo también un incremento en el contenido de ésteres totales. Las muestras de vino

inoculadas con los otros tres cultivos simples (UNQLp11, UNQOe31b y UNQOe73.2) no mostraron cambios significativos en el contenido de alcoholes totales, pero sí un incremento significativo en el de ésteres totales. La muestra inoculada con el cultivo mixto UNQLp11+UNQOe31b mostró un aumento en el contenido de alcoholes totales, y la inoculada con el cultivo simple de UNQLp11 mostró una disminución significativa en el contenido de ésteres totales (Tablas 4.4.2 y 4.4.3, Figura 4.4.3).

Como se observa en la Tabla 4.4.2, todos los compuestos volátiles analizados exhibieron una disminución en los valores de concentración en los ensayos de vinificación en los que se inocularon cultivos simples, mientras que el contenido de ésteres (Figura 4.4.3) mostró una tendencia creciente (excepto en la inoculación del cultivo simple de UNQLp11).

Es importante señalar que el succinato de dietilo resultó el único compuesto volátil que exhibió un incremento en su concentración al día 14, con la mayoría de los cultivos inoculados excepto con UNQLp11 y la combinación UNQLp11 + UNQOe31b. La inoculación de cultivos simples de UNQLp155, UNQOe31b y UNQOe73.2 dio origen a valores de concentración de succinato de dietilo de 5,46, 5,95 y 6,44 mg/L, respectivamente, al día 14. Por su parte, en los ensayos de vinificación con los cultivos mixtos UNQLp11 + UNQOe73.2, UNQLp155 + UNQOe31b y UNQLp155 + UNQOe73. 2, las muestras exhibieron valores superiores, de 6.45, 7.56 y 12.11 mg/L, respectivamente. Debe señalarse el posible efecto sinérgico manifestado por la inoculación del cultivo mixto UNQLp155 + UNQOe73.2.

Respecto al contenido de furfural, en todas las muestras de vino inoculadas con cultivos simples o mixtos, éste se redujo (Tablas 4.4.2 y 4.4.3).

En relación al compuesto volátil β -citronelol, pudo detectarse en las muestras de vino inoculadas con los cultivos simples de UNQLp11 y de UNQOe73.2, pero no en las inoculadas con cultivos mixtos conteniendo estas cepas (Tablas 4.4.2 y 4.4.3).

Finalmente, en ninguna de las muestras de vino inoculado pudo detectarse la presencia de diacetilo (2,3-butanodiol) (Tablas 4.4.2 y 4.4.3).

4.5. DISCUSIÓN

En este Capítulo se analizan los resultados de la inoculación de un vino Malbec patagónico, en etapa final de FA (etanol 12.4% v/v, pH 3.6, azúcares residuales <2.00 g/L, ácido L-málico 2.8 g/L, SO₂ total 96 mg/L, acidez total 3,98 g/L), y en ensayos a escala de laboratorio (80 mL de vino, incubados durante 14 días a 21 °C), con cultivos simples o mixtos de cepas lácticas nativas patagónicas, seleccionadas por sus características enológicas y tecnológicas. El propósito de estos ensayos fue el de evaluar su capacidad de conducir la FML en las condiciones detalladas, y los cambios generados en el vino.

En relación al contenido de ácidos orgánicos, se observó una mayor reducción del ácido L-málico del vino cuando se inocularon cultivos simples o mixtos de cepas de *Lb. plantarum*. Este resultado es concordante con la mayor supervivencia en vino exhibida por las cepas de esta especie respecto de las de *O. oeni*, pese al concepto generalizado de la superioridad adaptativa de las cepas enológicas de *O. oeni* a las estrictas condiciones del ambiente vino.

El análisis de implantación permitió confirmar, al día 14 de incubación, la presencia de las cepas inoculadas, si bien los porcentajes de implantación, tanto de cultivos simples como mixtos, nunca alcanzaron el 100%. Esto podría deberse a varias razones. En primer lugar, la presencia de ácido L-láctico en la muestra de vino inicial (Final FA) estaría indicando que el vino empleado ya había iniciado una FML espontánea, conducida por su población nativa de BAL. En estas condiciones, la inoculación con las cepas seleccionadas podría resultar menos efectiva (índice de implantación menor), dada la competencia con la población nativa en desarrollo. En segundo lugar, la disponibilidad de nutrientes también sería menor, y el vino podría contener bacteriocinas u otras toxinas producidas por cepas nativas, e inhibidoras del desarrollo de las BAL inoculadas. También debe mencionarse que la FA de este vino Malbec se indujo con la levadura nativa F8 de *S. cerevisiae* (del Mónaco et al. 2016), la cual podría resultar no compatible con las bacterias inoculadas, así como ciertas cepas nativas de levaduras no sacaromycéticas presentes en el vino.

En otro aspecto, debe considerarse que distintas levaduras no sacaromicéticas nativas (*Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Lachancea*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces Zygosaccharomyces* y *Saccharomyces*), podrían contribuir significativamente al perfil aromático del vino (Esteve-Zarzoso et al. 1998; Romano et al. 2003; García et al. 2010; Jolly et al. 2014). Durante la FA, algunas de estas especies son capaces de producir importantes compuestos aromáticos, como alcoholes superiores derivados de la vía de Ehrlich, ésteres etílicos y ésteres de acetato, en cantidades superiores a las originadas por especies del género *Saccharomyces* (Gamero et al. 2016; Belda et al. 2017). Barbosa et al. (2015) sugieren que el empleo de la inoculación mixta de levaduras sacaromicéticas y no-sacaromicéticas podría modular el aroma del vino contribuyendo no sólo de manera individual, sino también a través de la modificación de los patrones de expresión genómica de cepas de *S. cerevisiae*, dada su coexistencia durante la fermentación vínica.

Entre las levaduras no sacaromicéticas, *Schizosaccharomyces pombe* se ha utilizado con fines de desacidificación, debido a su capacidad para convertir el ácido L-málico en etanol (Suárez-Lepe et al. 2012). *Lachancea thermotolerans* se ha señalado recientemente como una especie adecuada para acidificar mostos de baja acidez, dada su capacidad de producir ácido L-láctico, hecho que también podría explicar la presencia del mismo en la muestra inicial del vino Malbec ensayado (FA final) (Kapsopoulou et al. 2005, 2007; Gobbi et al. 2013).

Si bien las modificaciones en el perfil de volátiles del vino y los cambios en las concentraciones de ácidos orgánicos son consecuencia de la acción conjunta de toda la comunidad microbiana del vino Malbec ensayado (microbiota natural y cepas inoculadas), el mayor consumo de ácido L-málico sólo se observó cuando éste se inoculó con cultivos de BAL seleccionadas. También es importante señalar que las mayores concentraciones de ácido L-láctico se detectaron en las muestras inoculadas con cultivos simples de las cepas UNQLp11 y UNQLp155 de *Lb.*

plantarum y en los mixtos conteniendo dichas cepas (UNQLp11 + UNQOe31b, UNQLp155 + UNQOe31b y UNQLp155 + UNQOe73.2).

Si bien numerosos autores han estudiado el control y la optimización del desarrollo de la FML por inoculación del vino con cultivos simples de BAL (Maicas et al. 1999; Ugliano et al. 2003; Pozo-Bayón et al. 2005; Costello et al. 2012; Garofalo et al. 2015; Iorizzo et al. 2016), ó con cultivos mixtos conteniendo cepas de *O. oeni* (Carreté et al. 2006), sólo existen actualmente dos cultivos malolácticos comerciales mixtos, que combinan una cepa de *O. oeni* y una de *Lb. plantarum*.

En nuestro caso, las cepas de BAL ensayadas son nativas de la región vitivinícola Patagonia y, como se mencionara previamente, el empleo de cepas autóctonas de un área específica de producción de vino está fuertemente recomendado por numerosos autores (Ruiz et al. 2010c; du Toit et al. 2011; Garofalo et al. 2015; Berbegal et al. 2016)(Ruiz et al. 2010b; du Toit et al. 2011; Garofalo et al. 2015; Berbegal et al. 2016). En estos estudios se ha demostrado que el buen desarrollo de la FML mejora el sabor del vino, reduciendo las notas herbáceas debidas al contenido de alcoholes C6 e incrementado las notas frutales por aumento del contenido de ésteres (Girard et al. 1997; Peinado et al. 2004; Costello et al. 2012; Feng et al. 2017). Los ensayos presentados en este Capítulo muestran que la inoculación de un vino Malbec con cultivos de cepas autóctonas de *Lb. plantarum* y de *O. oeni*, a excepción de los que incluían la cepa UNQLp11, provocó un incremento en los ésteres totales del vino. Si bien algunos ésteres mostraron disminución de su concentración, como butirato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo, en todas las muestras de vino se detectaron valores superiores al umbral sensorial, que se relacionan con notas aromáticas frutales (frutilla, plátano, manzana) (Peinado et al. 2004; Feng et al. 2017). En los casos de muestras de vino inoculadas con cultivos simples de las cepas UNQLp155, UNQOe31b y UNQOe73.2 ó con cultivos mixtos incluyendo estas cepas, pudo observarse un aumento notable en la concentración de succinato de dietilo (5,46, 5,95 y 6,44 mg/L, respectivamente). Particularmente, se advirtió un efecto sinérgico cuando las cepas UNQOe73.2 y UNQLp155 se inocularon como cultivo mixto. El incremento en la concentración de succinato de

dietilo se relaciona con el aroma a melón (Peinado et al. 2004) y se ha mencionado como una característica positiva en distintos tipos de vinos (Goldner et al. 2011; Knoll et al. 2012).

En relación al contenido de furfural en vino, se ha descrito que su reducción, por acción de BAL inoculadas, contribuye a disminuir las notas aromáticas similares al caramelo (Hale et al. 1999).

Las cepas UNQLp11 y UNQOe73.2 resultaron capaces de producir β -citronelol, que es un terpeno odorante liberado por la actividad β -glucosidasa, descrita previamente en algunas cepas de especies de BAL (Maturano & Saguir 2017). Si bien la concentración de este compuesto era menor al umbral sensorial, ambas cepas podrían poseer actividad β -glucosidasa que les permitiría hidrolizar precursores aromáticos glicosilados, liberando agliconas odorantes, tales como alcoholes terpénicos con aromas florales. La mejora de las propiedades organolépticas del vino requiere del desarrollo de cultivos iniciadores capaces de promoverlo, y para lograrlo resulta necesario profundizar los estudios sobre las capacidades de las cepas para modificar su perfil aromático.

Respecto a la supervivencia bacteriana en el ambiente vino, la cepa UNQLp155 persistió hasta el día 14 de FML del vino Malbec, en tanto su viabilidad en Pinot noir resultó menor (Brizuela et al. 2018). Esta diferencia podría deberse al contenido de etanol de ambos vinos, de 12,4% v/v en Malbec y de 14,5% v/v en Pinot noir; un mayor contenido de etanol puede inducir la disrupción de la membrana celular y, en consecuencia, una mayor tasa de mortalidad (Bravo-Ferrada et al. 2014).

4.6. CONCLUSIONES

Los resultados de este Capítulo revelan un comportamiento diferente, durante la FML de un vino Malbec, de cultivos simples y mixtos de cepas seleccionadas de *O. oeni* y *Lb. plantarum*. En relación a la modificación del perfil de compuestos volátiles del vino, las cepas *O. oeni* produjeron mayor cantidad de compuestos volátiles significativos, lo que indicaría un activo metabolismo bacteriano pese a su menor supervivencia respecto a las cepas de *Lb. plantarum*. La inclusión de cepas

de *Lb. plantarum* en los cultivos mixtos garantizó un mayor consumo de ácido L-málico, mientras que las cepas *O. oeni* indujeron mayores modificaciones en el perfil de volátiles del vino.

El empleo de cultivos mixtos para inducir la FML podría ofrecer una interesante innovación a aplicar en el proceso de vinificación, destinada a mejorar los atributos sensoriales y la calidad final del vino. Estos resultados, obtenidos a escala de laboratorio, deberán validarse en ensayos a escala piloto, como entorno más relevante.

También resulta importante hacer pruebas de co-inoculación de levaduras y BAL, permitiendo así que las fermentaciones alcohólica y maloláctica se desarrollen de modo simultáneo. Estudios recientes sugieren que la inoculación de BAL a las 24 ó 48 h de inoculadas las levaduras, reduce el tiempo total de la vinificación (Bartowsky et al. 2015; Krieger-Weber 2017), posibilita el desarrollo de una FML más eficiente, por el bajo nivel de etanol y la mayor disponibilidad de nutrientes (Lerm 2010), y permite una adaptación gradual de las bacterias al ambiente (Azzolini et al. 2010), sin necesidad de la etapa previa de aclimatación, contribuyendo así a la sustentabilidad del proceso de vinificación.



Conclusiones Generales

Los estudios de aislamiento, identificación y caracterización de cepas enológicas de BAL, nativas de la región vitivinícola Patagonia, se iniciaron en el año 2008, en el Laboratorio de Microbiología Molecular (Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes).

Los objetivos de trabajo de esta Tesis Doctoral se centraron en la optimización de las condiciones de aclimatación de cultivos, la preservación de los mismos, y el análisis de los cambios inducidos en vinos (sintéticos, estériles y no estériles) mediante la inoculación de cepas seleccionadas, en ensayos a escala de laboratorio. Para alcanzarlos se requirió de un abordaje interdisciplinar, que incluyó la microbiología clásica, la microbiología molecular, la bioquímica, la química de alimentos, la química analítica instrumental y la biotecnología.

Los resultados obtenidos permitieron lograr:

- Optimizar las condiciones de aclimatación (respecto de otras previamente ensayadas) y de inoculación que posibilitaran obtener mejores resultados en fermentaciones realizadas en vinos estériles, a escala de laboratorio.
- Demostrar el requerimiento de la aclimatación como etapa necesaria para la supervivencia bacteriana en vino y para la preservación por liofilización.
- Determinar la composición del medio de aclimatación más adecuado (si bien pueden existir diferencias entre cepas): medio rico adicionado de glucosa y fructosa, con etanol 6% v/v, y las condiciones de incubación del mismo (48 h, 21 °C).
- Seleccionar la trehalosa como el crioprotector más adecuado para la preservación de las cepas por liofilización.
- Comprobar que el desarrollo de la fermentación de un vino Pinot noir estéril, mediante inoculación de cultivos de cepas patagónicas de las especies *Lb. plantarum* y de *O. oeni*, resultó en una disminución de la concentración de alcoholes totales y un incremento de la de ésteres totales, contribuyendo a resaltar el aroma frutal de este varietal.

- Verificar el potencial de cultivos simples y mixtos de cepas nativas patagónicas, de las especies *Lb. plantarum* y *O. oeni*, de implantarse en vino Malbec no estéril, compitiendo con la microbiota autóctona (ensayos a escala de laboratorio). Las cepas de *Lb. plantarum* presentaron mayor capacidad de supervivencia y de consumo del ácido L-málico, en tanto que las de *O. oeni* impactaron más en la modificación del perfil de compuestos volátiles. Así, la inoculación de un *blend* de cepas de ambas especies de BAL, permitiría obtener vinos de mejor calidad sensorial en menor tiempo, reduciendo los riesgos en el proceso de vinificación.

Como en todo trabajo de investigación, los resultados alcanzados resolvieron parte de la problemática inherente a la formulación de cultivos iniciadores malolácticos nativos patagónicos. Quedan pendientes los ensayos en entornos relevantes, probando diferentes varietales tintos, y su elaboración de manera sustentable y económica, como para estar en condiciones de transferir estos productos a la industria vitivinícola.

Anexos

ANEXO 1

1.1. Extracción de DNA bacteriano

Los aislamientos considerados como BAL se cultivaron hasta fase exponencial en caldo MRS o MLO, según correspondiera, a 28 °C, en anaerobiosis. Las células se centrifugaron (5,000 x g, 15 min, 4 °C), se lavaron dos veces en Tris/ EDTA 1M, pH 7,0 y se resuspendieron en 1 ml de lisozima Tris-EDTA (20 mg/ml), incubándose durante 2 h a 37 °C. Tras la adición de 0,1 mg/ml de proteinasa K, las células se mantuvieron durante 1 h a 56 °C. Se adicionó Sarcozyl 1,5% y se incubaron a 65 °C durante 5 min. Por último, se realizó una extracción con fenol-cloroformo. El DNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa (Invitrogen) 0,7%, teñido con bromuro de etidio, en presencia de un *ladder* de PM de 400 pb, para controlar su grado de integridad.

1.2. Identificación de aislamientos mediante análisis ARDRA del gen 16S rRNA.

Se amplificó un fragmento de 1500 pb del gen ribosomal 16S rRNA utilizando los *primers* pA-16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y pH-16SR (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Rodas et al. 2003). La mezcla de reacción consistió en 3 µl de buffer 10x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl pH 8,4), 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 100 nM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 40 ng de DNA cromosomal y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen Corp.), en un volumen total de 30 µl. La amplificación se realizó en un ciclador *Eppendorf* modelo Mastercycler Gradient, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C, 5 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, *annealing* a 58 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 1 min. La extensión final se realizó a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1%, con bromuro de etidio (0,5 mg/ml), y se visualizaron por transiluminación con luz UV.

Los amplicones del gen 16S rRNA se sometieron a análisis de restricción con la enzima *MseI* (Fermentas International Inc., Canadá); 1 µg de DNA y 100 U de la enzima se incubaron durante 16 h a 37 °C. Los fragmentos de digestión se

visualizaron en gel de agarosa 1,5%, en presencia de un marcador de PM de 400 pb.

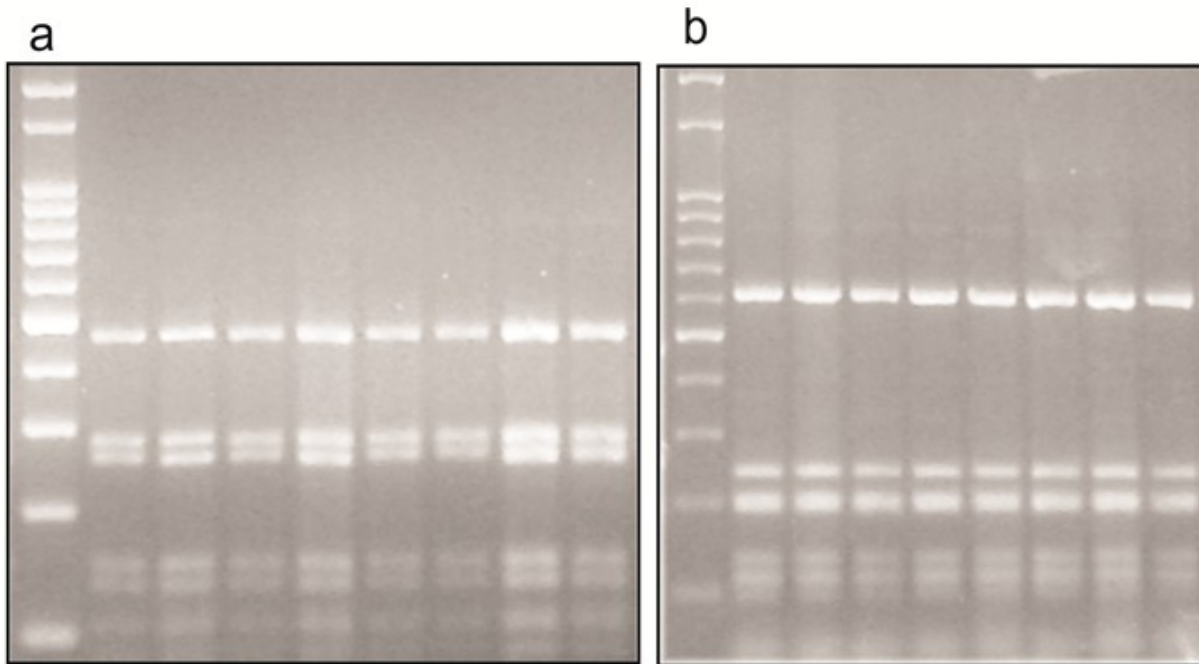


Figura 1.2- Patrones de restricción PCR-ARDRA - *16S rRNA*, con la enzima *MseI*. **Panel A:** aislamientos identificados como *Lb. plantarum*, calle 1: marcador PM 100 bp, calle 2: control positivo (*Lb. plantarum* ATCC 14917), calles 3 a 7: aislamientos UNQLp24, UNQLp26, UNQLp27, UNQLp29, UNQLp30, UNQLp31 y UNQLp32. **Panel B:** aislamientos identificados como *O. oeni*, calle 1: marcador de PM 100 bp, calle 2: control positivo (*O. oeni* ATCC 27310), calles 3 a 7: aislamientos UNQOe1, UNQOe2, UNQOe3, UNQOe4, UNQOe5, UNQOe6 y UNQOe7 (Brizuela 2013).

1.3. Identificación de aislamientos mediante secuenciación del gen *16S rRNA*

Los amplicones del gen *16S rRNA* se purificaron utilizando el kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN Corp. California, USA). La determinación de la secuencia se realizó en un equipo 3730XL, bajo condiciones de ciclado *BigDye* (Macrogen Corp., Corea). El análisis de secuencias se llevó a cabo por comparación de las mismas con secuencias depositadas en el *GenBank*, utilizando el Programa Blasón.

1.4. Tipificación genética mediante análisis RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)

Para las amplificaciones por PCR se utilizó el *primer* Coc (5'-AGCAGCGTGG- 3') (Cocconcelli et al., 1995). La mezcla de reacción consistió en 1,5 µl de buffer 10x (Invitrogen Corp.), 0,2 mM de cada dNTP, 100 nM de *primer*, 2,5 nM de MgCl₂, 80 ng de DNA cromosomal y 1,5 U de *Taq* DNA polimerasa, en un volumen de 20 µl. La amplificación se realizó en un ciclador *Eppendorf* modelo Mastercycler Gradient, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C, 4 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C, 1 min, *annealing* a 30 °C, 30 s y extensión a 72 °C, 2 min. La amplificación se completó con una incubación de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5%, en presencia de bromuro de etidio (0,5mg/ml) y de un marcador de PM de 100 pb PB-L (Productos Bio-Lógicos-UNQ).

1.4.1. Tipificación genética mediante análisis RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) – Control de implantación de cultivos inoculados

Los porcentajes de implantación de los cultivos inoculados se evaluaron mediante RAPD-PCR con el *primer* M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') (Stenlid et al. 1994).

El DNA se extrajo de acuerdo a Bravo-Ferrada et al. (2011), se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, 1000) y se controló su integridad y la ausencia de RNA por electroforesis en gel de agarosa 1,0% (p/v). Las reacciones de amplificación se realizaron según Delfederico et al. (2006) y los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2,0% (p/v), con un *ladder* de 100 pb (Productos Bio-Lógicos, UNQ). La evaluación de la capacidad porcentual de implantación de las cepas se realizó comparando los perfiles RAPD de cada colonia seleccionada con los perfiles de cada cepa inoculada. En base a la presencia o ausencia del mismo patrón RAPD que el control de cada cepa en la cantidad total de colonias analizadas, se estimó el porcentaje de implantación de las cepas en cada muestra.

A continuación, se muestran algunos geles obtenidos:

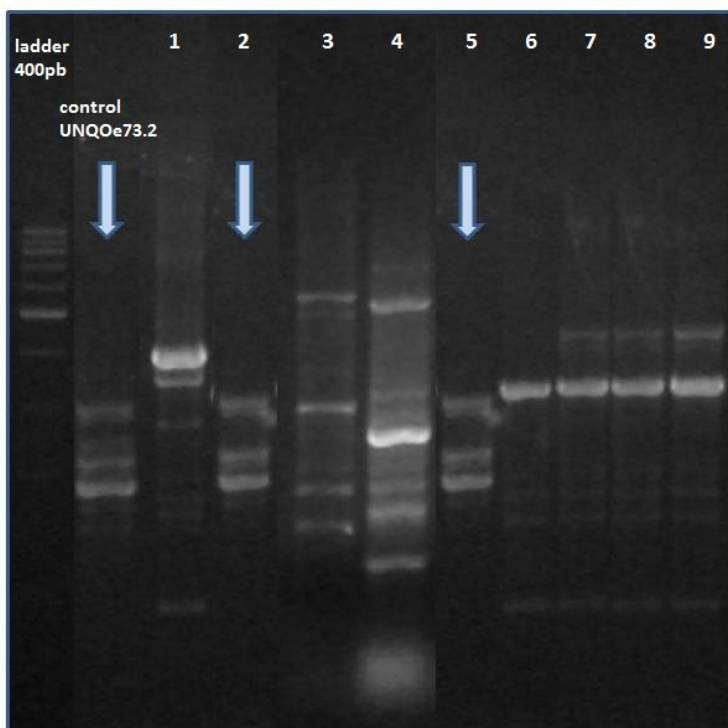


Figura 1.4.1.A. Patrones PCR-RAPD correspondientes al análisis de implantación de cultivos de la cepa UNQOe73.2 en las muestras de vino Malbec.

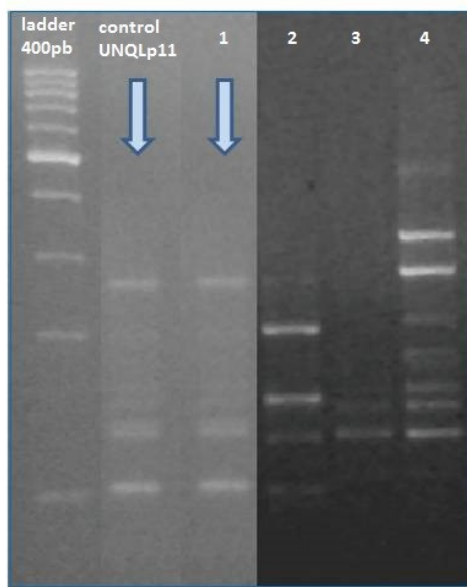


Figura 1.4.1.B. Patrones de restricción PCR-RAPD correspondientes al análisis de implantación de cultivos de la cepa UNQLp11 en las muestras de vino Malbec.

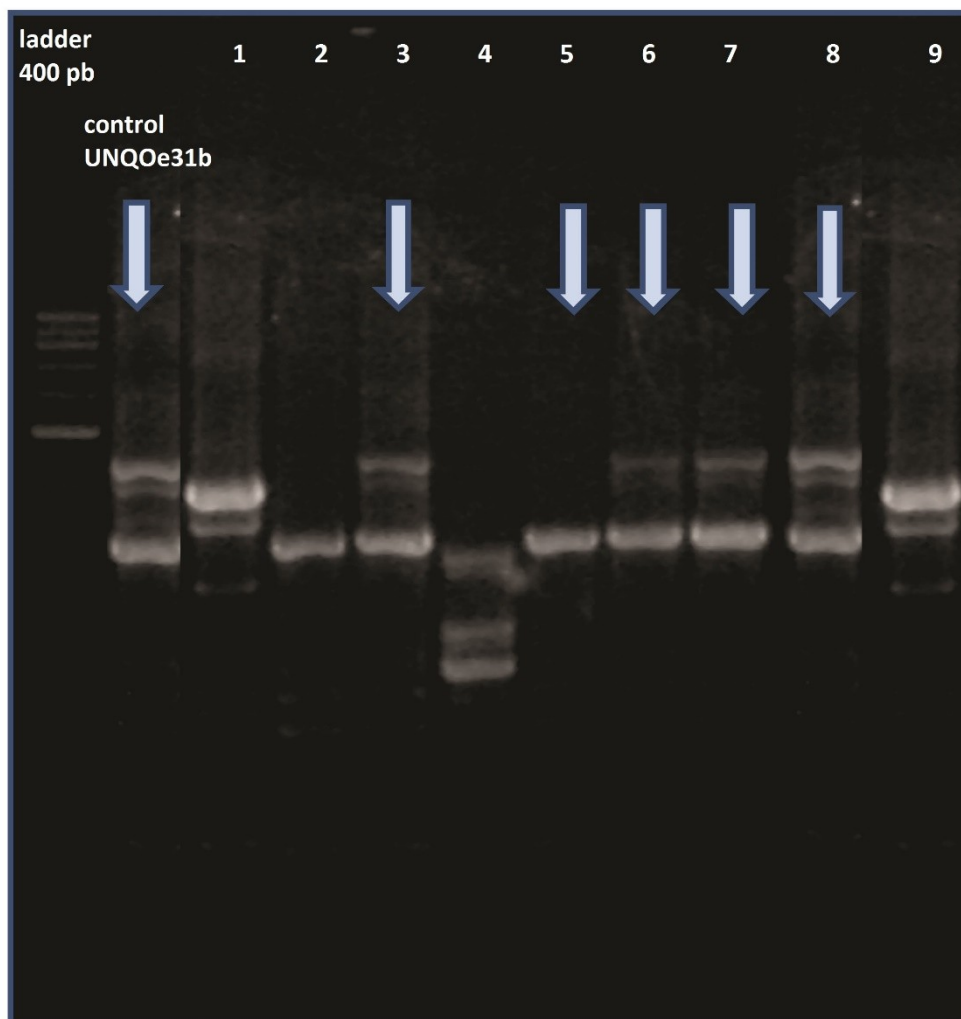


Figura 1.4.1.C. Patrones de restricción PCR-RAPD correspondientes al análisis de implantación de cultivos de la cepa UNQOe31b en las muestras de vino Malbec.

1.5. Construcción de dendrogramas a partir de datos RAPD-PCR

Para la exploración del grado de relación entre perfiles RAPD-PCR obtenidos con el *primer* Coc, se construye una matriz de datos en base a la cual se generaron matrices de distancia. Con las matrices de distancia se construyeron dendrogramas, aplicando el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages). El análisis se llevó a cabo con el programa Clustal X.

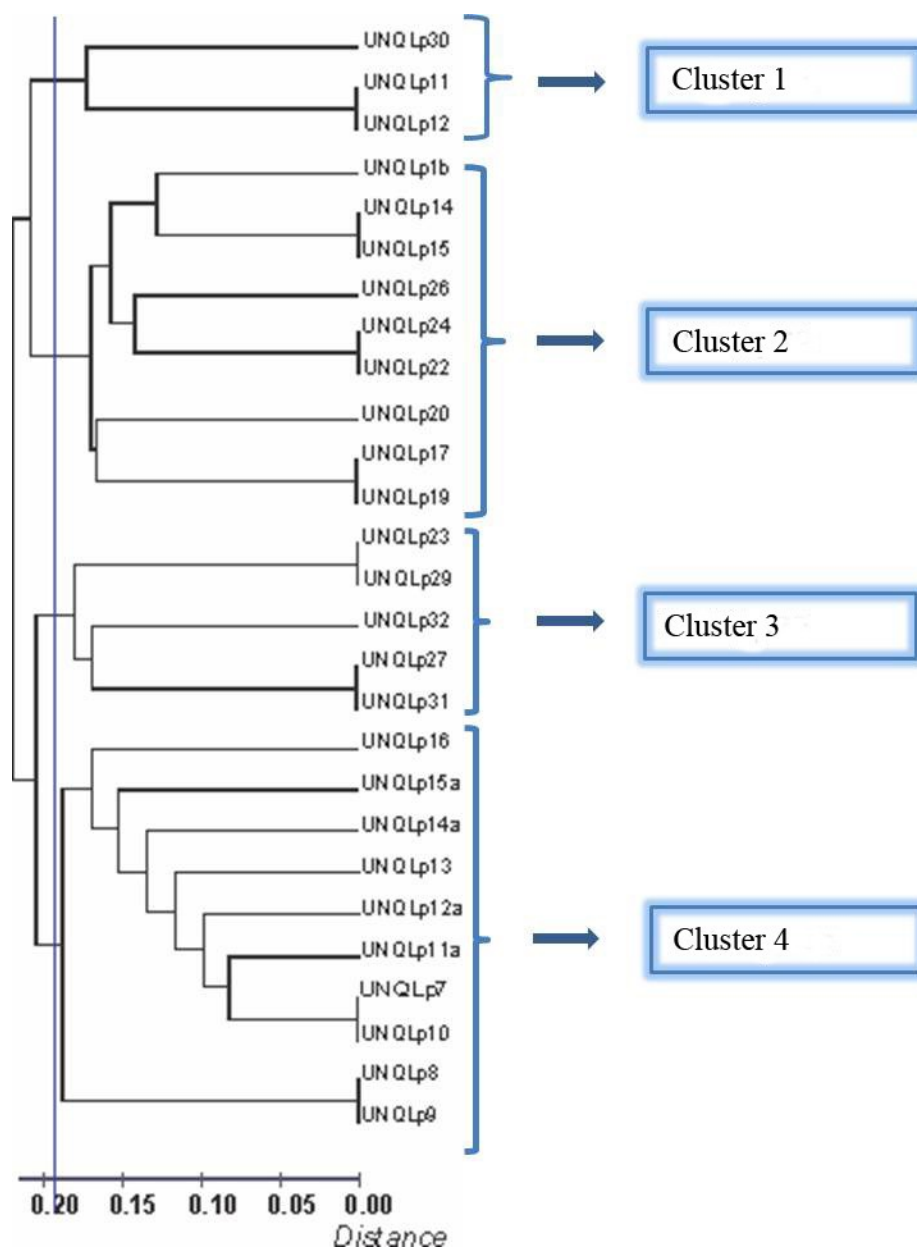


Figura 1.5. Ejemplo de dendrograma correspondiente a aislamientos de la especie *Lb. plantarum* (Brizuela 2013)

ANEXO 2

2.1. *Micro-extracción en fase sólida*

El objetivo de la etapa de extracción es separar el analito de la matriz a la que está unido. Para ello, la muestra se pone en contacto con un extractante, en condiciones que debiliten las interacciones analito – matriz, e incrementen las analito – extractante. Existen diferentes técnicas de extracción, como las de Líquido – Líquido (LLE), de Líquidos Presurizados (PLE), de Fluidos Supercríticos (SFE), de Micro-Extracción en Fase Líquida (LPME) o de Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME). Esta última fue la elegida para la obtención de compuestos volátiles a partir de las muestras de vino.

La SPME se basa en el principio de distribución de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. La fibra es de sílice fundida y está recubierta de un sorbente (materiales poliméricos idénticos a los empleados como fase estacionaria en columnas de cromatografía de gases). El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra comienza cuando la muestra entra en contacto con la fibra. Luego, mediante temperatura o un solvente orgánico, se produce la desorción de los analitos. La extracción se considera completa y satisfactoria cuando el analito alcanza un equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra (Pawliszyn 2000).

La extracción se puede efectuar tanto en espacio de cabeza o *headspace* (HS) como por inmersión directa de la fibra en la muestra. La primera es útil para analitos volátiles en muestras líquidas ó sólidas; la segunda para analitos orgánicos en muestras sólidas. La Figura 2.1 muestra el esquema de ambos procesos.



Figura 2.1. Esquema del proceso SPME-GC

Las fibras poseen recubrimientos de diferente tipo, de modo de poder utilizar SPME para separar un amplio grupo de compuestos. En general se emplean recubrimientos polares, como PA o carbowax (CW), para analitos polares (fenoles) y recubrimientos apolares, como PDMS, para analitos apolares (tolueno, benceno y etilbenceno) (Diwan et al. 2016). Las fibras pueden ser comerciales o pueden elaborarse para que resulten apropiadas a aplicaciones específicas. Como ejemplo, fibras de carbón (Aranda et al. 2000), polipirrol (Yuan et al. 2001) o fibras recubiertas con polímeros de huella molecular (MIPs) (Hu et al. 2012).

La Figura 2.2 muestra ambos tipos de fenómenos y las fibras adecuadas al proceso mayoritario. Si la composición de las fibras combina más de un polímero (mixtas), como PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenceno), CW/DVB (carbowax/divinilbenceno) o CW/TPR (carbowax/templated resin), éstas resultan más adecuadas para analitos volátiles, ya que la principal interacción entre fibra y analitos ocurre por vía de la adsorción, al ser polímeros sólidos (mayores coeficientes de distribución de los analitos) (Shirey & Mindrup 1999).

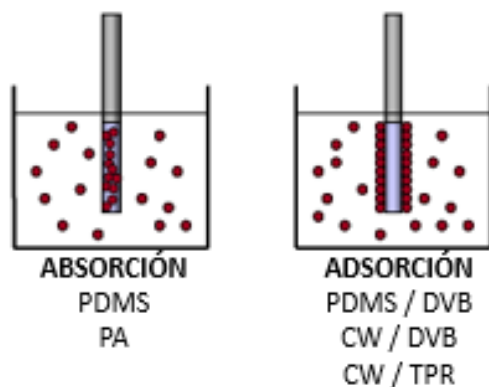


Figura 2.2. Clasificación de las fibras SPME.

2.2. Cromatografía gaseosa

Cuando se emplea cromatografía gaseosa (GC), los analitos se desorben térmicamente, en el inyector de un cromatógrafo. Al aumentar la temperatura, se reduce la afinidad de los compuestos por la fibra y los analitos ingresan a la columna analítica mediante el flujo del gas portador (gas inerte). Los puertos de inyección están adecuados para realizar la desorción de los analitos de la fibra.

Los componentes principales de un GC son (Figura 2.2.1):

- Fuente de gas
- Sistema de inyección
- Horno y columna cromatográfica
- Sistema de detección
- Sistema de registro

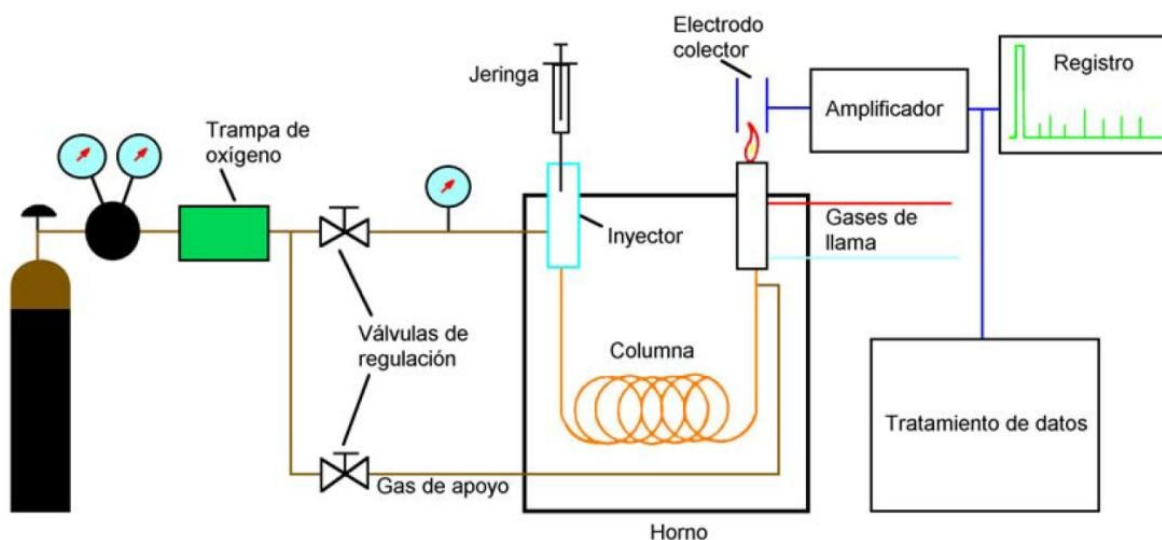


Figura 2.2.1. Esquema de un cromatógrafo de gases.

Separados los analitos de la muestra en la columna, se detectan por un sistema a la salida de ésta, capaz de brindar una señal proporcional a la cantidad de analito. Los detectores más empleados son de tipo diferencial, es decir, no ofrecen señal cuando sólo pasa el gas portador y responden ante una propiedad que muestre variación cuando el gas se encuentra mezclado con un analito eluido (Valcarcel Cases 1988).

La espectrometría de masas (MS) es una de las herramientas analíticas de aplicación más general, ya que puede suministrar información sobre (Jansson et al. 2004; Hoffmann & Jackson 2015):

- a) La composición cuali y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras complejas.
- b) Las estructuras de amplia variedad de especies moleculares complejas.
- c) Las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras.
- d) La estructura y composición de superficies sólidas.

Cuando se acopla GC con MS, la técnica cromatográfica ofrece mayores posibilidades de separación de compuestos y permite identificar con mayor

seguridad los compuestos. Esta técnica combinada reúne elevada sensibilidad con capacidad de aportar información estructural procedente del espectrómetro (Hoffmann & Jackson 2015).

Los analitos extraídos también se pueden detectar con un analizador de triple cuadrupolo (MS/MS), como muestra la Figura 2.2.2 (Tekel' & Hatrík 1996; Toldrá & Reig 2006). Se trata de tres cuadrupolos ubicados de manera secuencial, donde el primero y el último (Q1 y Q3) actúan como un cuadrupolos normales, y al segundo, de características especiales, se denomina celda de colisión. En la celda se introduce una pequeña cantidad de gas inerte (He, Ar), de forma que los iones que ingresan colisionan y se fragmentan. Los iones formados pasan a Q3 para ser analizados.

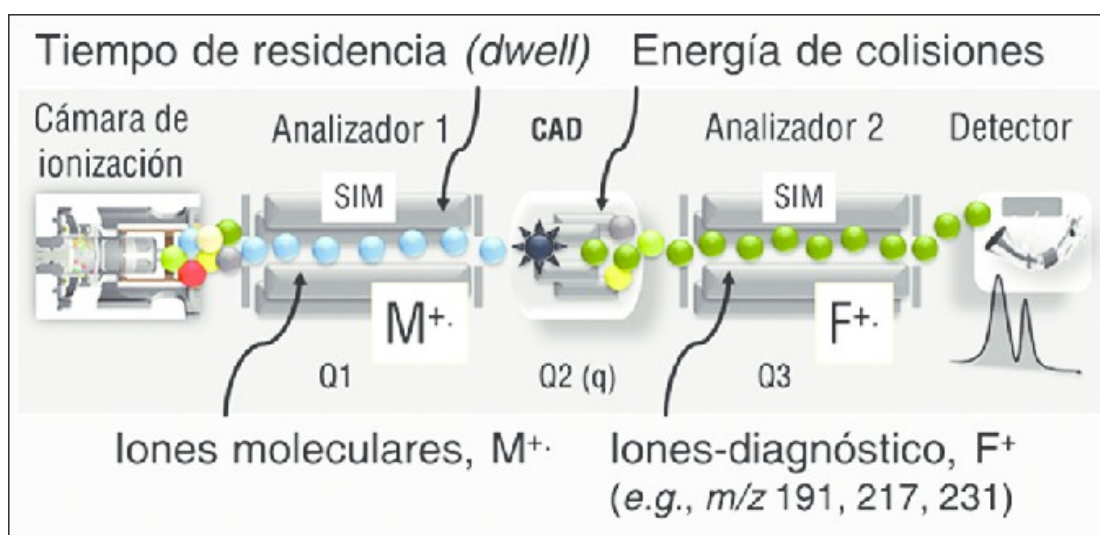


Figura 2.2.2. Esquema analizador de triple cuadrupolo.

Los cuadrupolos Q1 y Q3 funcionan como filtro de masas y pueden trabajar en modo SIM o SCAN, de manera independiente (Tekel' & Hatrík 1996).

En este trabajo se aplicó el sistema de registro del *software* Agilent MSD Chem Station (versión D.01.02 16), que permite programar las condiciones de análisis y el listado de muestras (*sample list*). Así se optimiza el rendimiento y la

productividad de todos los módulos, ya que se trabaja integrando el *software* al CG/MS.

2.3. Construcción de curvas de calibración para compuestos volátiles

Se preparan soluciones stock con reactivos puros de los diferentes compuestos volátiles a evaluar. Luego de pesarlos, se los disuelve en etanol absoluto filtrado. En base a la masa (mg) pesada, se calcula la concentración inicial de cada compuesto a utilizar en la calibración.

TERPENOS	MG PESADOS	MG/L	DISOL CALIB 1/50
ALFA-PINENE	22,80	912	18,24
BETA-PINENE	22,03	881,2	17,624
LIMONENE	25,00	1000	20
LINALOOL	27,90	1116	22,32
TERPINEN-4-OL	35,00	1400	28
ALFA-TERPINEOL	13,07	522,8	10,456
BETA-CITRONELOL	34,40	1376	27,52
NEROL (CIS-GERANIOL)	33,30	1332	26,64
GERANIOL (TRANS)	23,90	956	19,12

En cada punto de la recta de calibración se calcula la concentración de acuerdo a la ecuación: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, donde C_i de cada compuesto se obtiene de la Tabla precedente (disolución de calibración), V_f es volumen de los viales (8 ml de vino), y V_i corresponde a volúmenes de disolución de calibración, empleados en cada punto de la recta; en este ejemplo serían 0,005; 0,02; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 y 0,25.

RECTA DE CALIBRADO-VOLUMENES (VFVIAL=8ML)

	0,005	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
	p1(mg/L)	p2 (mg/L)	p3 (mg/L)	p4 (mg/L)	p5 (mg/L)	p6 (mg/L)	p7 (mg/L)
ALFA-PINENE	0,0114	0,0456	0,114	0,228	0,342	0,456	0,57
BETA-PINENE	0,011015	0,04406	0,11015	0,2203	0,33045	0,4406	0,55075
LIMONENE	0,0125	0,05	0,125	0,25	0,375	0,5	0,625
LINALOOL	0,01395	0,0558	0,1395	0,279	0,4185	0,558	0,6975
TERPINEN-4-OL	0,0175	0,07	0,175	0,35	0,525	0,7	0,875
ALFA- TERPINEOL	0,006535	0,02614	0,06535	0,1307	0,19605	0,2614	0,32675
BETA- CITRONEOL	0,0172	0,0688	0,172	0,344	0,516	0,688	0,86
NEROL (CIS- GERANIOL)	0,01665	0,0666	0,1665	0,333	0,4995	0,666	0,8325
GERANIOL (TRANS)	0,01195	0,0478	0,1195	0,239	0,3585	0,478	0,5975

En las soluciones de calibración se incluyen los compuestos a emplear como patrones internos, que se agregarán a la muestra a analizar (en igual concentración), y se utilizarán para normalizar los valores de área a cada compuesto.

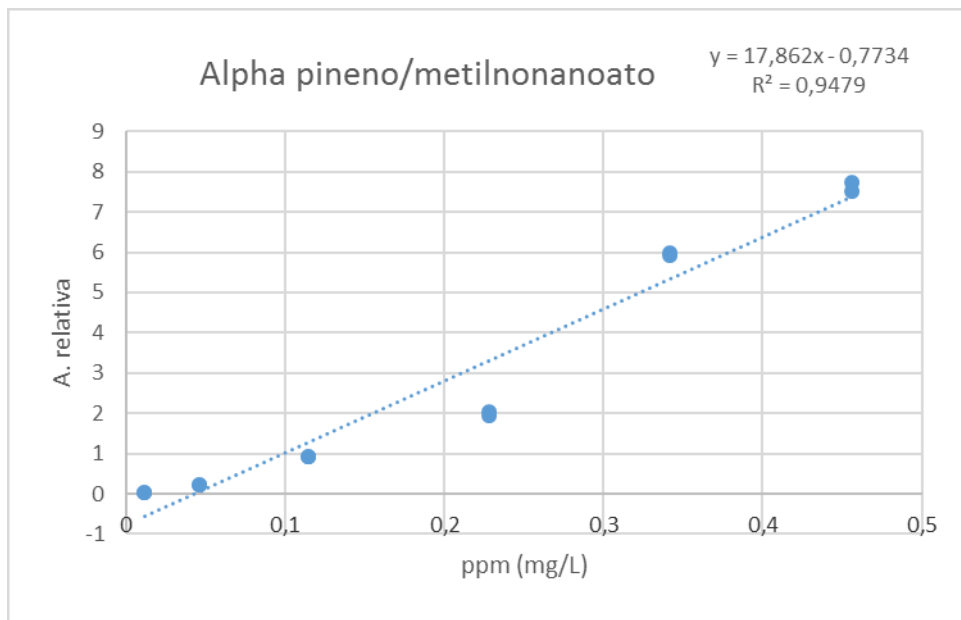
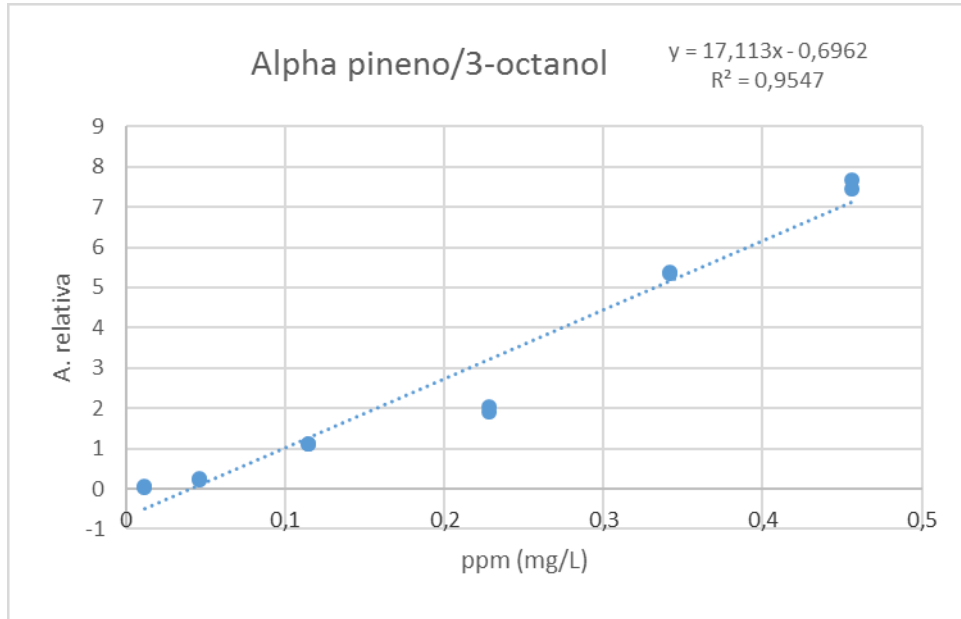
Una vez integradas las curvas obtenidas del análisis por GC-MS, se efectúa la corrección de las áreas absolutas, alcanzadas para cada compuesto, en relación a los patrones internos utilizados. En este ejemplo se utilizaron 3 compuestos patrón: 3-octanol, metilnonanoato y 3-4 dimetil fenol. Se muestra para el caso del compuesto volátil alfa-pineno (terpeno):

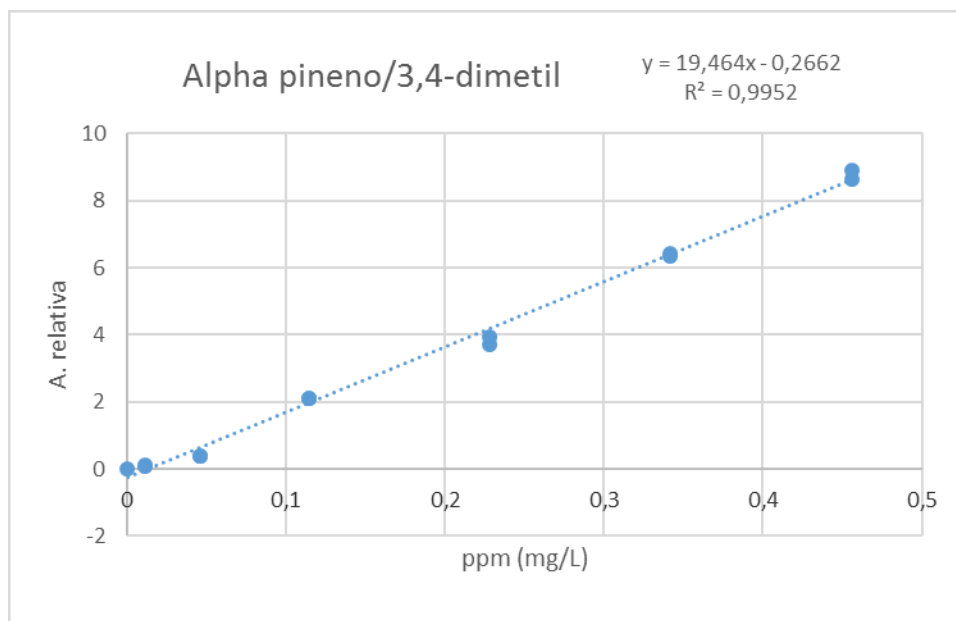
ALPHA PINENO

	mg/L	A. Abs	A/pi (3 oct)	A/Pi /(metilnona)	A/Pi(3,4-dimetil)
P1	0,0114	461088	0,045791515	0,043410041	0,094183001
P1	0,0114	493046	0,048965324	0,04641879	0,100710823
P2	0,0456	1787212	0,240855095	0,214403469	0,396960536
P2	0,0456	1746598	0,235381715	0,209531197	0,387939695
P3	0,114	6205826	1,106916783	0,928738706	2,101640857
P3	0,114	6211481	1,10792545	0,929585011	2,103555957
P4	0,228	10664561	1,921430872	1,931159523	3,708724956
P4	0,228	11292774	2,034615826	2,044917559	3,927193324
P5	0,342	11505069	5,384433115	5,97272808	6,415917962
P5	0,342	11400003	5,335261671	5,918184239	6,357326845
P6	0,456	13828269	7,688043734	7,732735402	8,900106486
P6	0,456	13426274	7,464548289	7,507940746	8,641375744
P7	0,57	16850083	15,37608533	15,76419777	16,26600335
P7	0,57	15857546	14,47037267	14,83562373	15,30787097

	3-OCTANOL	METIL NONANOATO	3,4-DIMETIL	
P1	10069289	10621690	4895660,5	Tabla valores Patrones internos para cada punto de la recta
P2	7420279	8335742	4502241	
P3	5606407	6681993,5	2952848	
P4	5550322,5	5522361,5	2875533	
P5	2136728	1926267	1793207	
P6	1798672	1788276,5	1553719,5	
P7	1095863	1068883	1035908	

Realizada la normalización de los valores de área relativa para cada patrón interno, se elaboran 3 gráficos (uno por patrón), donde los valores de X son los de concentración en cada punto, y los de Y son los de área relativa a cada patrón interno. En los 3 gráficos se elabora la línea de tendencia y el valor de R; el mejor valor de R determinará la recta a utilizar para el cálculo de concentración de ese compuesto. Por lo tanto, en la muestra incógnita deberá normalizarse el valor del compuesto por ese patrón interno.





En este ejemplo, la recta con mejor valor de R para alfa-pineno es la normalizada con 3-4 dimetil fenol. Significa que el valor de área para alfa-pineno en la muestra de vino, debe normalizarse por el valor que se obtiene para 3-4 dimetil fenol (agregado a la muestra con los otros patrones).

Con el valor normalizado, se realiza la extrapolación en la curva obtenida, cuya ecuación sería: $Y=19,464x - 0,2662$. El valor de X indica la concentración (mg/L) de alfa-pineno presente en la muestra de vino.

El procedimiento se repite para cada compuesto volátil hallado en vino, considerando que cada uno debe normalizarse respecto al patrón en el que se obtuvo mejor R; por ende, no todos los compuestos se normalizarán con el mismo patrón.



Bibliografía

- Abadias M, Teixidó N, Usall J, et al (2001) Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *J Food Prot* 64:856–861. doi: 10.4315/0362-028X-64.6.856
- Alexandre H, Costello PJ, Remize F, et al (2004) *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol* 93:141–154. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2003.10.013
- Ananta E, Volkert M, Knorr D (2005) Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J* 15:399–409. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.004
- Andorrà I, Landi S, Mas A, et al (2008) Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol* 25:849–856. doi: 10.1016/j.fm.2008.05.005
- Andujar-Ortiz I, Moreno-Arribas MV, Martín-Álvarez PJ, Pozo-Bayón MA (2009) Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography–mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. *J Chromatogr A* 1216:7351–7357. doi: 10.1016/J.CHROMA.2009.08.055
- Aranda R, Kruus P, Burk R. (2000) Assessment of polycrystalline graphites as sorbents for solid-phase microextraction of nonionic surfactants. *J Chromatogr A* 888:35–41. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00490-8
- Azzolini M, Tosi E, Vagnoli P, et al (2010) Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Ital J Food Sci* 3:257–263
- Bae S, Fleet GH, Heard GM (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* 100:712–727. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x
- Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153:243–259
- Barbosa C, Mendes-Faia A, Lage P, et al (2015) Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microb Cell Fact* 14:. doi: 10.1186/s12934-015-0318-1
- Barry JA, Gawrisch K (1994) Direct NMR Evidence for Ethanol Binding to the Lipid-Water Interface of Phospholipid Bilayers. *Biochemistry* 33:8082–8088. doi: 10.1021/bi00192a013
- Bartowsky EJ (2005) *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust J Grape Wine Res* 11:174–187. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x
- Bartowsky EJ, Borneman AR (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni*

- strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:441–447. doi: 10.1007/s00253-011-3546-2
- Bartowsky EJ, Costello PJ, Chambers PJ (2015) Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust J Grape Wine Res* 21:663–669. doi: 10.1111/ajgw.12185
- Bartowsky EJ, Henschke PA (1999) Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Aust J Grape Wine Res* 5:39–44. doi: 10.1111/j.1755-0238.1999.tb00150.x
- Bartowsky EJ, Henschke PA (2004) The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol* 96:235–252. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.05.013
- Battermann G, Radler F (1991) A comparative study of malolactic enzyme and malic enzyme of different lactic acid bacteria. *Can J Microbiol* 37:211–217. doi: 10.1139/m91-032
- Bauer R, Dicks LMT (2004) Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. *South African J Enol Vitic* 25:74–88. doi: 10.21548/25-2-2141
- Belda I, Ruiz J, Esteban-Fernández A, et al (2017) Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. *Molecules* 22
- Beltramo C, Desroche N, Tourdot-Maréchal R, et al (2006) Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Res Microbiol* 157:267–274. doi: 10.1016/j.resmic.2005.07.006
- Beneduce L, Spano G, Vernile A, et al (2004) Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *J Basic Microbiol* 44:10–16. doi: 10.1002/jobm.200310281
- Berbegal C, Peña N, Russo P, et al (2016) Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiol* 57:187–194. doi: 10.1016/J.FM.2016.03.002
- Berbegal C, Spano G, Tristezza M, et al (2017) Microbial resources and innovation in the wine production sector. *South African J Enol Vitic* 38:156–166. doi: 10.21548/38-2-1333
- Betteridge A, Grbin P, Jiranek V (2015) Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* 33:547–553
- Bilhère E, Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2009) Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: Detection of two subpopulations shaped by intergenic recombinations. *Appl Environ Microbiol* 75:1291–1300. doi: 10.1128/AEM.02563-08
- Bloem A, Bertrand A, Lonvaud-Funel A, De Revel G (2006) Vanillin production

- from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* 44:62–67. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02037.x
- Bokulich NA, Bergveinson J, Ziola B, Mills DA (2015) Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contaminaton and resistance. *Elife* 4:
- Bokulich NA, Joseph CML, Allen G, et al (2012) Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLoS One* 7:e36357. doi: 10.1371/journal.pone.0036357
- Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA (2014) Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E139-48. doi: 10.1073/pnas.1317377110
- Bon E, Delaherche A, Bilhère E, et al (2009) *Oenococcus oeni* genome plasticity is associated with fitness. *Appl Environ Microbiol* 75:2079–90. doi: 10.1128/AEM.02194-08
- Bordas M, Araque I, Alegret JO, et al (2013) Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Int Microbiol* 16:113–123. doi: 10.2436/20.1501.01.186
- Borneman AR, Bartowsky EJ, McCarthy J, Chambers PJ (2010) Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:681–691. doi: 10.1007/s00253-009-2425-6
- Borneman AR, McCarthy JM, Chambers PJ, Bartowsky EJ (2012) Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics* 13:. doi: 10.1186/1471-2164-13-373
- Boulton RB, Singleton VL (Vernon L., Bisson LF, Kunkel RE (Ralph E. (1996) *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US
- Bourdineaud J-P, Nehmé B, Tesse S, Lonvaud-Funel A (2003) The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl Environ Microbiol* 69:2512–20. doi: 10.1128/aem.69.5.2512-2520.2003
- Bravo-Ferrada BM, Brizuela NS, Gerbino E, et al (2015a) Effect of protective agents and previous acclimation on ethanol resistance of frozen and freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strains. *Cryobiology* 71:522–528. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.10.154
- Bravo-Ferrada BM, Delfederico L, Hollmann A, et al (2011) *Oenococcus oeni* from Patagonian red wines: Isolation, characterization and technological properties. *Int J Microbiol Res* 3:48–55
- Bravo-Ferrada BM, Gómez-Zavaglia A, Semorile L, Tymczyszyn EE (2015b) Effect of the fatty acid composition of acclimated oenological *Lactobacillus plantarum*

- on the resistance to ethanol. *Lett Appl Microbiol* 60:155–161. doi: 10.1111/lam.12350
- Bravo-Ferrada BM, Gonçalves S, Semorile L, et al (2015c) Study of surface damage on cell envelope assessed by AFM and flow cytometry of *Lactobacillus plantarum* exposed to ethanol and dehydration. *J Appl Microbiol* 118:1409–1417. doi: 10.1111/jam.12796
- Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Brizuela NS, et al (2016) Growth and consumption of l-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiol (Praha)* 61:. doi: 10.1007/s12223-016-0446-y
- Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Delfederico L, et al (2013) Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1537–1549. doi: 10.1007/s11274-013-1337-x
- Bravo-Ferrada BM, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A, Semorile L (2014) Effect of acclimation medium on cell viability, membrane integrity and ability to consume malic acid in synthetic wine by oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *J Appl Microbiol* 116:360–367. doi: 10.1111/jam.12372
- Brizuela NS (2013) Selección y caracterización de aislamientos de *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* de vinos patagónicos a ser empleados como cultivos iniciadores autóctonos de fermentación maloláctica. Universidad Nacional de Quilmes
- Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, La Hens DV, et al (2017) Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *LWT* 77:348–355. doi: 10.1016/J.LWT.2016.11.023
- Brizuela NS, Bravo-Ferrada BM, Pozo-Bayón MÁ, et al (2018) Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains. *Food Res Int* 106:. doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.032
- Capozzi V, Russo P, Beneduce L, et al (2010) Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett Appl Microbiol* 50:327–334. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02795.x
- Cappello MS, Blevé G, Grieco F, et al (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J Appl Microbiol* 97:1274–1280. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02412.x
- Cappello MS, Zapparoli G, Logrieco A, Bartowsky EJ (2017) Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int J Food Microbiol* 243:16–27. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.11.025
- Cappello MS, Zapparoli G, Stefani D, Logrieco A (2010) Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic

- fermentation of Malvasia Nera wine. *Syst Appl Microbiol* 33:461–467. doi: 10.1016/j.syapm.2010.09.003
- Carrascosa A V ., Muñoz R , González R (2005) *Microbiología del vino* . Antonio Madrid Vicente
- Carreté R, Reguant C, Rozès N, et al (2006) Analysis of *Oenococcus oeni* Strains in Simulated Microvinifications with Some Stress Compounds. *Am J Enol Vitic* 36:302–313
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al (2003a) Effects of Addition of Sucrose and Salt, and of Starvation upon Thermotolerance and Survival During Storage of Freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Food Sci* 68:2538–2541. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07057.x
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al (2002) Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnol Lett* 24:1587–1591. doi: 10.1023/A:1020301614728
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 14:835–847. doi: 10.1016/J.IDAIRYJ.2004.02.001
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al (2003b) Protective effect of sorbitol and monosodium \nglutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait* 83:203–210. doi: 10.1051/lait:2003010
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, et al (2008) Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnol Prog* 20:248–254. doi: 10.1021/bp034165y
- Casp A, Abril J (1999) *Procesos de conservación de Alimentos*, 2nd Editio. Madrid
- Caspritz, G., & Radler F (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *J Biol Chemistry* 258:4907–4910
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1997) Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *J Appl Microbiol* 82:87–94. doi: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x
- Catania C, Monte SA del (1999) Los cultivares para vino en la Argentina. In: Seminario internacional “Hacia la enología del siglo XXI”
- Cecconi D, Milli A, Rinalducci S, et al (2009) Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis* 30:2988–2995. doi: 10.1002/elps.200900228
- Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal P-A, Guzzo J (2005) Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and

- cell viability. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1717:118–124. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.09.015
- Cocolin L, Alessandria V, Dolci P, et al (2013) Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int J Food Microbiol* 167:29–43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008
- Cocolin L, Bisson LF, Mills DA (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 189:81–87. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09210.x
- Corral-Lugo A, García YEM, Pazos-Rojas LA, et al (2012) Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por sellado (o estampado) masivo.” *Rev Colomb en Biotecnol* 14:147–156
- Costantini A, García-Moruno E, Moreno-Arribas V (2009) Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. pp 27–57
- Costantini A, Rantsiou K, Majumder A, et al (2015) Complementing DIGE proteomics and DNA subarray analyses to shed light on *Oenococcus oeni* adaptation to ethanol in wine-simulated conditions. *J Proteomics* 123:114–127. doi: 10.1016/J.JPROT.2015.04.019
- Costello P j, Morrison GJ, Fleet G., Lee T. (1983) Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. Council of Australian Food Technology Associations
- Costello PJ, Francis IL, Bartowsky EJ (2012) Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of cabernet sauvignon wine: Interactive influences of *oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. *Aust J Grape Wine Res* 18:287–301. doi: 10.1111/j.1755-0238.2012.00196.x
- Costello PJ, Siebert TE, Solomon MR, Bartowsky EJ (2013) Synthesis of fruity ethyl esters by acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase and reverse esterase activities in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 114:797–806. doi: 10.1111/jam.12098
- Coulibaly I, Dubois-Dauphin R, Danthine S, et al (2011) Preservation of industrial’s lactic acid bacteria (probiotics) by freeze-drying. *Biotechnol Agron Société Environnement* 15:287–299
- Couto JA, Campos FM, Figueiredo AR, Hogg TA (2006) Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. *Am J Enol Vitic* 44:99–112
- Crisóstomo B (2007) Caracterización fisicoquímica de mostos de uva de la Región Sur destinados a vinificación. UNCO, Argentina
- Curtin CD, Bellon JR, Henschke PA, et al (2007) Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res* 7:471–481. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00183.x

- Da Silveira MG, Abee T (2009) Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *J Appl Microbiol* 106:1690–6. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04136.x
- Da Silveira MG, Golovina E a, Hoekstra F a, et al (2003) Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl Environ Microbiol* 69:5826–32. doi: 10.1128/AEM.69.10.5826
- Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, et al (1985a) Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. American Society of Enologists
- Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, et al (1985b) Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *Am J Enol Vitic* 36:290–301. doi: 10.1016/S0963-9969(99)00122-2
- Davis CR, Wibowo DJ, Lee TH, Fleet GH (1986) Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Appl Environ Microbiol* 51:539–545
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130–135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
- de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G (1985) Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology* 22:574–577. doi: 10.1016/0011-2240(85)90034-3
- de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G (1983) Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology* 20:560–566. doi: 10.1016/0011-2240(83)90044-5
- del Mónaco SM, Curilén YL, Bravo SME, et al (2016) Wild yeasts selection for high-quality Patagonian wines. In: *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Springer International Publishing, pp 277–300
- Delaquis P, Cliff M, King M, et al (2000) Effect of Two Commercial Malolactic Cultures on the Chemical and Sensory Properties of Chancellor Wines Vinified with Different Yeasts and Fermentation Temperatures. *Am J Enol Vitic* 51:42–48
- Delfederico L, Hollmann A, Martínez M, et al (2006) Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *J Dairy Res* 73:20. doi: 10.1017/S0022029905001408
- Di Toro MR, Capozzi V, Beneduce L, et al (2015) Intraspecific biodiversity and “spoilage potential” of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT - Food Sci Technol* 60:102–108. doi: 10.1016/j.lwt.2014.06.059
- Diwan A, Singh B, Roychowdhury T, et al (2016) Porous, High Capacity Coatings for Solid Phase Microextraction by Sputtering. *Anal Chem* 88:1593–1600. doi: 10.1021/acs.analchem.5b03181

- du Toit M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S (2011) Lactobacillus: The Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures-an Overview. *Food Bioprocess Technol* 4:876–906. doi: 10.1007/s11947-010-0448-8
- Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Ramon D, Querol A (1998) The role of non-saccharomyces yeast in industrial winemaking. *Int Microbiol* 1:143–148
- Feng H, Skinkis PA, Qian MC (2017) Pinot noir wine volatile and anthocyanin composition under different levels of vine fruit zone leaf removal. *Food Chem* 214:736–744. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.110
- Ferreira V, López R, Cacho JF (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J Sci Food Agric* 80:1659–1667. doi: 10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6
- Fiocco D, Capozzi V, Goffin P, et al (2007) Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:909–915. doi: 10.1007/s00253-007-1228-x
- Fleet G. (1993) Yeast-growth during fermentation. In: Publishers HA (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur, Switzerland, pp 27–54
- Fonseca F, Béal C, Corrieu G (2001) Operating Conditions That Affect the Resistance of Lactic Acid Bacteria to Freezing and Frozen Storage. *Cryobiology* 43:189–198. doi: 10.1006/CRYO.2001.2343
- Fonseca F, Pénicaud C, Tymczyszyn EE, et al (2019) Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-019-10002-1
- Franks F (1998) Freeze-drying of bioproducts: Putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45:221–229
- Fugelsang KC, Edwards CG (2007) Managing microbial growth. In: Springer Science and Business Media (ed) *Wine microbiology: Practical implications and procedures*, 2nd edn. New York, pp 67–68
- G-Alegría E, López I, Ruiz JI, et al (2004) High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett* 230:53–61. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00854-1
- G. Zhang, Fan M, Li Y, et al (2012) Effect of growth phase, protective agents, rehydration media and stress pretreatments on viability of *Oenococcus oeni* subjected to freeze-drying. *African J Microbiol Res* 6:1478–1484. doi: 10.5897/AJMR11.1336
- Gamero A, Quintilla R, Groenewald M, et al (2016) High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol* 60:147–159. doi: 10.1016/j.fm.2016.07.006

- García V, Vásquez H, Fonseca F, et al (2010) Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Rev Argent Microbiol* 42:226–229
- Garofalo C, El Khoury M, Lucas P, et al (2015) Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J Appl Microbiol* 118:1395–1408. doi: 10.1111/jam.12789
- Girard B, Kopp TG, Reynolds AG, Cliff M (1997) Influence of Vinification Treatments on Aroma Constituents and Sensory Descriptors of Pinot noir Wines. *Am J Enol Vitic* 48:198–206
- Gobbi M, Comitini F, Domizio P, et al (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol* 33:271–281. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.004
- Gockowiak H, Henschke PA (2003) Interaction of pH, ethanol concentration and wine matrix on induction of malolactic fermentation with commercial “direct inoculation” starter cultures. *Aust J Grape Wine Res* 9:200–209. doi: 10.1111/j.1755-0238.2003.tb00271.x
- Goldner MC, Di P, Lira L, et al (2011) Influence of Polyphenol Levels on the Perception of Aroma in *Vitis vinifera* cv. Malbec wine
- González-Arenzana L, López R, Santamaría P, et al (2012) Dynamics of Indigenous Lactic Acid Bacteria Populations in Wine Fermentations from La Rioja (Spain) During Three Vintages. *Microb Ecol* 63:12–19. doi: 10.1007/s00248-011-9911-y
- González-Arenzana L, Santamaría P, López R, López-Alfaro I (2013) Indigenous lactic acid bacteria communities in alcoholic and malolactic fermentations of Tempranillo wines elaborated in ten wineries of La Rioja (Spain). *Food Res Int* 50:438–445. doi: 10.1016/j.foodres.2012.11.008
- González-Barreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J (2015) Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55:202–218. doi: 10.1080/10408398.2011.650336
- Graça da Silveira M, Vitória San Romão M, Loureiro-Dias MC, et al (2002) Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl Environ Microbiol* 68:6087–93. doi: 10.1128/AEM.68.12.6087
- Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V (2005a) Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J Appl Microbiol* 99:1061–1069. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02707.x
- Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V (2005b) A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 105:233–244. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.011
- Guilloux-Benatier M, Le Fur Y, Feuillat M (1998) Influence of fatty acids on the

- growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:144–149. doi: 10.1038/sj.jim.2900502
- Guinard, J. X., & Cliff M (1987) Descriptive Analysis of Pinot noir Wines from Carneros, Napa, and Sonoma. *Am J Enol Vitic* 38:211–215
- Guzzo J, Jobin M-P, Delmas F, et al (2000) Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *Int J Food Microbiol* 55:27–31. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00209-9
- Hale MD, Mccafferty K, Larmie, E., Newton J, Swan JS (1999) The Influence of Oak Seasoning and Toasting Parameters on the Composition and Quality of Wine. *Am J Enol Vitic* 50:495–502
- Hayman DC, Monk P. (1982) Starter culture preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. Council of Australian Food Technology Associations
- Henschke P. (2003) Bacterial cultures available for winemaking. *Technol Rev MIT's Mag Innov* 147:20
- Hoffmann WD, Jackson GP (2015) Forensic Mass Spectrometry. *Annu Rev Anal Chem*
- Hu X, Cai Q, Fan Y, et al (2012) Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fibers for determination of Sudan I–IV dyes in hot chili powder and poultry feed samples. *J Chromatogr A* 1219:39–46. doi: 10.1016/J.CHROMA.2011.10.089
- Huey B, Hall J (1989) Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J Bacteriol* 171:2528–2532. doi: 10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989
- Iorizzo M, Testa B, Lombardi SJ, et al (2016) Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT* 73:557–566. doi: 10.1016/J.LWT.2016.06.062
- Jansson C, Pihlström T, Österdahl B-G, Markides KE (2004) A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1023:93–104. doi: 10.1016/J.CHROMA.2003.10.019
- Jofré M, Combina M, Fanzone M, Catania C (2003) Composición química varietal de vinos Malbec de Mendoza, Argentina: primeros resultados. In: IX Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología
- Jolly NP, Varela C, Pretorius IS (2014) Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14:215–237
- Kapsopoulou K, Kapaklis A, Spyropoulos H (2005) Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans*

- isolated in Greece. *World J Microbiol Biotechnol* 21:1599–1602. doi: 10.1007/s11274-005-8220-3
- Kapsopoulou K, Mourtzini A, Anthoulas M, Nerantzis E (2007) Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:735–739. doi: 10.1007/s11274-006-9283-5
- Knoll C, Fritsch S, Schnell S, et al (2012) Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1143–1153. doi: 10.1007/s11274-011-0917-x
- Krieger-Weber S (2017) Application of yeast and bacteria as starter cultures. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer International Publishing, pp 605–634
- Kunkee RE (Ralph E. (1974) *Malolactic Fermentation and winemaking*. American Chemical Society
- Labarre C, Diviès C, Guzzo J (1996a) Genetic organization of the *mle* locus and identification of a *mleR*-like gene from *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* 62:4493–8
- Labarre C, Guzzo J, Cavin JF, Diviès C (1996b) Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* 62:1274–82
- Laforgue R, Guérin L, Pernelle JJ, et al (2009) Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *J Appl Microbiol* 107:1208–1218. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04309.x
- Lee J-E, Hong Y-S, Lee C-H (2009) Characterization of Fermentative Behaviors of Lactic Acid Bacteria in Grape Wines through ¹H NMR- and GC-Based Metabolic Profiling. *J Agric Food Chem* 57:4810–4817. doi: 10.1021/jf900502a
- Lerm E (2010) The selection and characterisation of lactic acid bacteria to be used as a mixed starter culture for malolactic fermentation
- Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2011) Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African J Enol Vitic* 32:280–295
- Lerm E, Engelbrecht L, Du Toit M (2010) Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. *South African J Enol Vitic* 31:186–212
- Li C, Zhao J-L, Wang Y-T, et al (2009a) Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1659–1665. doi: 10.1007/s11274-009-0060-0
- Li H, WenYing Z, Hua W, et al (2009b) Influence of culture pH on freeze-drying

- viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. *Food Bioprod Process* 87:56–61. doi: 10.1016/j.fbp.2008.06.001
- Liu S-Q (2002) Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J Appl Microbiol* 92:589–601. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01589.x
- Lodato P, Segovia de Huergo M, Buera MP (1999) Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:215–220. doi: 10.1007/s002530051511
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. In: *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 317–331
- Lonvaud-Funel A (1995) Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiol Lett* 126:209–214. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07420.x
- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Desens C (1988) Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J Sci Food Agric* 44:183–191. doi: 10.1002/jsfa.2740440209
- López I, López R, Santamaría P, et al (2008) Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines
- Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, et al (2003) Design and Evaluation of PCR Primers for Analysis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:6801–6807. doi: 10.1128/AEM.69.11.6801-6807.2003
- Loubiere P, Salou P, Leroy MJ, et al (1992) Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J Bacteriol* 174:5302–8. doi: 10.1128/jb.174.16.5302-5308.1992
- Lucio O, Pardo I, Krieger-Weber S, et al (2016) Selection of *Lactobacillus* strains to induce biological acidification in low acidity wines. *LWT - Food Sci Technol* 73:334–341. doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.031
- Maicas S, Pardo I, Ferrer S (2000) The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. *Int J food ...* 75–79. doi: 10.1046/j.1365-2621.2000.00359.x
- Maicas S, Pardo I, Ferrer S (1999) Continuous malolactic fermentation in red wine using free *Oenococcus oeni*. *World J Microbiol Biotechnol* 15:737–739
- Mansilla MC, Cybulski LE, Albanesi D, De Mendoza D (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* 186:6681–6688
- Martineau B, Henick-Kling T (1995) Performance and diacetyl production of

- commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J Appl Bacteriol* 78:526–536. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03095.x
- Matheus M (2004) Estudio de factibilidad para la producción de Uvas (*vitis vinifera*), vino y vinagre en Imbabura. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Matthews A, GRBIN PR, JIRANEK V (2006) A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Aust J Grape Wine Res* 12:235–244. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00063.x
- Matthews A, Grimaldi A, Walker M, et al (2004) Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl Environ Microbiol* 70:5715–31. doi: 10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004
- Maturano C, Saguir FM (2017) Influence of glycosides on behavior of *Oenococcus oeni* in wine conditions: growth, substrates and aroma compounds. *World J Microbiol Biotechnol* 33:151. doi: 10.1007/s11274-017-2316-4
- Miles AA, Rogosa D, Sharpe ME (1938) The estimation of bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)* 38:732–749
- Miller BJ, Franz CMAP, Cho G-S, du Toit M (2011) Expression of the Malolactic Enzyme Gene (*mle*) from *Lactobacillus plantarum* Under Winemaking Conditions. *Curr Microbiol* 62:1682–1688. doi: 10.1007/s00284-011-9914-4
- Millet V, Lonvaud-Funel A (2000) The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett Appl Microbiol* 30:136–141. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x
- Mills DA, Rawsthorne H, Parker C, et al (2005) Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiol Rev* 29:465–475. doi: 10.1016/j.fmrr.2005.04.011
- Mtshali PS, Divol B, Du Toit M (2012) Identification and characterization of *Lactobacillus* florum strains isolated from South African grape and wine samples. *Int J Food Microbiol* 153:106–113. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.023
- Mtshali PS, Divol B, Van Rensburg P, Du Toit M (2010) Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. *J Appl Microbiol* 108:1389–1397. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04535.x
- Murga MLF, Font de Valdez G, Disalvo AE (2000) Changes in the Surface Potential of *Lactobacillus acidophilus* under Freeze–Thawing Stress. *Cryobiology* 41:10–16. doi: 10.1006/CRYO.2000.2259
- Nault I, Gerbaux V, Larpent JP, Vayssier Y (1995) Influence of Pre-culture conditions on the ability of *leuconostoc oenos* to conduct Malolactic Fermentation in wine. *American Society of Enologists*
- Nielsen JC, Richelieu M (1999) Control of flavor development in wine during and

- after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 65:740–5
- Olguin N, Alegret JO, Bordons A, Reguant C (2011) -Glucosidase Activity and *bgl* Gene Expression of *Oenococcus oeni* Strains in Model Media and Cabernet Sauvignon Wine. *Am J Enol Vitic* 62:99–105. doi: 10.5344/ajev.2010.10044
- Olguin N, Bordons A, Reguant C (2009) Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* 26:197–203. doi: 10.1016/J.FM.2008.09.004
- Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43:93–100
- Olsen EB, Russell JB, Henick-Kling T (1991) Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: A basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J Bacteriol* 173:6199–6206. doi: 10.1128/jb.173.19.6199-6206.1991
- Pawliszyn J (2000) Theory of Solid Phase Microextraction. *J Chromatogr Sci* 38:270–278
- Peinado RA, Moreno J, Medina M, Mauricio JC (2004) Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures. *Biotechnol Lett* 26:757–762. doi: 10.1023/B:BILE.0000024102.58987.de
- Pembrey RS, Marshall KC, Schneider RP (1999) Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties? *Appl Environ Microbiol* 65:2877 LP – 2894
- Pérez-Martín F, Seseña S, Fernández-González M, et al (2014) Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int J Food Microbiol* 190:44–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.020
- Perry SF (1998) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Mol Biotechnol* 9:59–64. doi: 10.1007/BF02752697
- Petruzzi L, Capozzi V, Berbegal C, et al (2017) Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Front. Microbiol.* 8
- Pilone GJ, Kunkee RE (Ralph E. (1972) Characterization and Energetics of *Leuconostoc oeno ml* 34. American Society of Enologists
- Pinto C, Pinho D, Cardoso R, et al (2015) Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Front Microbiol* 6:. doi: 10.3389/fmicb.2015.00905
- Polášková P, Herszage J, Ebeler SE (2008) Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chem Soc Rev* 37:2478–2489. doi: 10.1039/b714455p
- Pozo-Bayón M a., G-Alegría E, Polo MC, et al (2005) Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and

- Lactobacillus plantarum starter cultures. *J Agric Food Chem* 53:8729–8735. doi: 10.1021/jf050739y
- Prahl C (1991) U.S Patent No. 5.077,060
- Ray B, Jezeski JJ, Busta FF (1971) Effect of Rehydration on Recovery, Repair, and Growth of Injured Freeze-Dried Salmonella anatum. *Appl Environ Microbiol* 22:
- Rayne S, Eggers NJ (2007) 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wines: Estimating non-microbial sourced contributions and toxicological considerations. *J Environ Sci Heal Part B* 42:887–897. doi: 10.1080/03601230701623365
- Renouf V, Strehaiano P, Lonvaud-Funei A (2007) Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *OENO One* 41:51. doi: 10.20870/oeno-one.2007.41.1.858
- Ribereau-Gayon P (2000) *The Microbiology of wine and vinifications -Handbook of Enology Vol. 1*. Chichester, England
- Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2003) Chapter 1.7.6. In: Edagricole (ed) *Trattato di Enologia 2 - Chimica del vino*, 2nd edn.
- Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006) *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatment*. John Wiley
- Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2003) 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Syst Appl Microbiol* 26:412–422. doi: 10.1078/072320203322497446
- Rodríguez-Bencomo JJ, Muñoz-González C, Andújar-Ortiz I, et al (2011) Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *J Sci Food Agric* 91:2484–2494. doi: 10.1002/jsfa.4494
- Rojo-Bezares B, Saenz Y, Navarro L, et al (2007) Coculture-inducible bacteriocin activity of Lactobacillus plantarum strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol* 24:482–491. doi: 10.1016/j.fm.2006.09.003
- Romano P, Fiore C, Paraggio M, et al (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86:169–180. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00290-3
- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML (2010a) Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control* 21:70–75. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2009.04.002
- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML (2008) Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol*

25:942–948. doi: 10.1016/J.FM.2008.06.007

- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML (2010b) Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int J Food Microbiol* 137:230–235. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.11.027
- Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, Palop ML (2010c) Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1555–1562. doi: 10.1007/s00253-010-2492-8
- Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Navarro L, et al (2009) Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Int J Food Microbiol* 134:176–183. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.004
- Šajbidor J (1997) Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit Rev Biotechnol* 17:87–103. doi: 10.3109/07388559709146608
- Salema M, Capucho I, Poolman B, et al (1996a) In vitro reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *J Bacteriol* 178:5537–9. doi: 10.1128/jb.178.18.5537-5539.1996
- Salema M, Lolkema JS, Romão MVS, Dias MCL (1996b) The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *J Bacteriol* 178:3127–3132. doi: 10.1128/JB.178.11.3127-3132.1996
- Salema M, Poolman B, Lolkema JS, et al (1994) Uniport of Monoanionic L-malate in Membrane Vesicles from *Leuconostoc Oenos*. *Eur J Biochem* 225:289–295. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00289.x
- Santivarangkna C, Higl B, Foerst P (2008) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol* 25:429–441. doi: 10.1016/J.FM.2007.12.004
- Santivarangkna C, Wenning M, Foerst P, Kulozik U (2007) Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J Appl Microbiol* 102:748–756. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x
- Santos MI, Araujo-Andrade C, Esparza-Ibarra E, et al (2014) Galacto-oligosaccharides and lactulose as protectants against desiccation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Biotechnol Prog* 30:1231–1238. doi: 10.1002/btpr.1969
- Schwab C, Vogel R, Gänzle MG (2007) Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology* 55:108–114. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004
- Shirey RE, Mindrup RF (1999) SUPELCO SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber is Best for Your Application?

- Silveira MG, Baumgärtner M, Rombouts FM, Grac M (2004) Effect of Adaptation to Ethanol on Cytoplasmic and Membrane Protein Profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 70:2748–2755. doi: 10.1128/AEM.70.5.2748
- Simes AB, del Carmen Maturano R, Tassile V, et al (2016) Molecular and Kinetic Characterization of the Fermentative Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from North Patagonia. *Adv Microbiol* 06:733–744. doi: 10.4236/aim.2016.69072
- Solieri L, Genova F, De Paola M, Giudici P (2010) Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: A framework for selection of new starter cultures. *J Appl Microbiol* 108:285–298. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04428.x
- Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S (2007) In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr Microbiol* 54:9–13. doi: 10.1007/s00284-006-0136-0
- Spano G, Massa S (2006) Environmental Stress Response in Wine Lactic Acid Bacteria: Beyond *Bacillus subtilis*. *Crit Rev Microbiol* 32:77–86. doi: 10.1080/10408410600709800
- Spano G, Rinaldi a, Ugliano M, et al (2005) A beta-glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J Appl Microbiol* 98:855–61. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02521.x
- Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, et al (2010) Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr* 64:S95–S100. doi: 10.1038/ejcn.2010.218
- Stenlid J, Karlsson J-O, Högberg N (1994) Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycol Res* 98:57–63. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80337-7
- Stiles ME, Holzapel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1–29. doi: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0
- Styger G, Prior B, Bauer FF (2011) Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:1145–1159
- Suárez-Lepe JA, Palomero F, Benito S, et al (2012) Oenological versatility of *Schizosaccharomyces* spp. *Eur. Food Res. Technol.* 235:375–383
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem* 121:1–16. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2009.12.004
- Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11:139–173. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x

- Tekel' J, Hatrik Š (1996) Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. *J Chromatogr A* 754:397–410. doi: 10.1016/S0021-9673(96)00489-X
- Theunissen JJH, Stolz E, Michel MF (1993) The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. *J Appl Bacteriol* 75:473–477. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb02804.x
- Toldrá F, Reig M (2006) Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Sci Technol* 17:482–489. doi: 10.1016/J.TIFS.2006.02.002
- Tomasino E, Harrison R, Breitmeyer J, et al (2015) Aroma composition of 2-year-old New Zealand Pinot Noir wine and its relationship to sensory characteristics using canonical correlation analysis and addition/omission tests. *Aust J Grape Wine Res* 21:376–388. doi: 10.1111/ajgw.12149
- Tristezza M, di Feo L, Tufariello M, et al (2016) Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT - Food Sci Technol* 66:406–412. doi: 10.1016/J.LWT.2015.10.064
- Tymczyszyn EE, Díaz R, Pataro A, et al (2008) Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *Int J Food Microbiol* 128:342–347. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.09.009
- Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA (2007) Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Appl Microbiol* 102:845–851. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03108.x
- Ugliano M, Genovese A, Moio L (2003) Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem* 51:5073–5078. doi: 10.1021/jf0342019
- Vailiant H, Formisyn P, Gerbaux V (1995) Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *J Appl Bacteriol* 79:640–650. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb00949.x
- Valcarcel Cases M. GHA (1988) *Técnicas analíticas de separación*. Reverte
- Valdés La Hens D, Bravo-Ferrada BM, Delfederico L, et al (2015) Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation in Patagonian red wines revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted gene. *Aust J Grape Wine Res* 21:49–56. doi: 10.1111/ajgw.12110
- Velly H, Fonseca F, Passot S, et al (2014) Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *J Appl Microbiol* 117:729–740. doi: 10.1111/jam.12577

- Vogt E (1984) *El vino: obtención, elaboración y análisis*. España
- Volschenk H, Van Vuuren HJJ (2006) Malic Acid in Wine : Origin , Function and Metabolism during Vinification. *S Afr J Enol Vitic* 27:123–136. doi: 10.21548/27-2-1613
- Weber FJ, De Bont JAM (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1286:225–245
- Wibowo D, Eschenbruch R, Davis CR, et al (1985) Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am J Enol Vitic* 36:302–313
- Wolfe J, Bryant G (1999) Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane–Solute–Water Systems. *Cryobiology* 39:103–129. doi: 10.1006/CRYO.1999.2195
- Yao AA, Dortu C, Egounlety M, et al (2009) Production of freeze-dried lactic acid bacteria starter culture for cassava fermentation into gari. *African J Biotechnol* 8:4996–5004
- Yuan H, Mullett WM, Pawliszyn J (2001) Biological sample analysis with immunoaffinity solid-phase microextraction. *Analyst* 126:1456–1461. doi: 10.1039/b101854j
- Zayed G, Roos YH (2004) Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochem* 39:1081–1086. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00222-X
- Zhao G, Zhang G (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* 99:333–338. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x
- Zhao G, Zhang G (2009) Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Int J Food Microbiol* 135:64–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.021

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a la Dra. Liliana Semorile por abrirme las puertas de su laboratorio hace ya muchos años y permitirme trabajar en este hermoso grupo de trabajo. Le agradeceré siempre la confianza depositada en mí, y por estar siempre disponible a ofrecerme oportunidades para crecer como profesional.

Segundo, pero no menos importante, a mi directora Eli. Gracias por toda la confianza que me tuviste desde el día cero, la infinita paciencia, las risas de siempre, y por enseñarme a enfrentar el trabajo del día a día con una sonrisa y con la mente positiva. Gracias por incentivar me a siempre ir para adelante, a no rendirse, y a dar siempre lo mejor de uno. Sos gran persona y te voy a estar siempre agradecida por todo lo que me enseñaste, tanto profesional como personalmente.

A mis compañeros de trabajo, a ellos que me aguantan hacen muchos años: A Barbi, Danay, Meli, Paulo, Gabi, Nair, Lucre. Gracias por tanta ayuda, compañerismo y sobretodo, por todas las risas que hemos compartido. Definitivamente el trabajo no hubiese sido igual sin ustedes, Gracias!!

A mi compañero de vida, Fer. Gracias por la paciencia de los casi 5 años del doctorado, especialmente la que me tuviste en este último tiempo de escritura. Pero, sobre todo, gracias por apoyarme siempre en mi carrera, en los tantos viajes, y a incentivar me a ser cada vez mejor profesional. Saber que tengo siempre tu apoyo no tiene precio. Gracias por eso y por todo lo que ya sabes!

Quiero además agradecerle a mi familia, que siempre me dieron su apoyo para que crezca no solo en lo profesional, sino también como persona. Son mi pilar en la vida, y nada de todo esto hubiera pasado sin su apoyo.

A mis amigos, en especial a aquellos que me trajo mi vida en Bernal y la Universidad. A ellos, mis amigos de la vida, con quienes después de tantos años compartidos, con algunos incluso de convivencia, siguen estando en mi vida, y que espero nunca dejen de estarlo. A todos uds, aunque algunos ya estén lejos, gracias por tantos años hermosos, llenos de risas y buenos momentos. Son personas más que especiales para mí y con las que espero me queden muchos años para seguir compartiendo. Los quiero y gracias por todo el apoyo y consejos que me brindaron.

Y por último, y no por eso menos importante, a la Universidad Nacional de Quilmes y al Departamento de Ciencia y Tecnología por brindarme el lugar de trabajo para desarrollar el trabajo correspondiente a esta tesis doctoral, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme la Beca Interna Doctoral.